

(11) Número de Publicação: **PT 2753646 T**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/28 (2017.01) **A61K 39/395** (2017.01)

A61P 35/00 (2017.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2012.09.05**

(30) Prioridade(s): **2011.09.05 GB 201115280**

(43) Data de publicação do pedido: **2014.07.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.11.22**
027/2018

(73) Titular(es):

ALLIGATOR BIOSCIENCE AB

MEDICON VILLAGE SCHEELEVÄGEN 2 223 70
LUND **SE**

(72) Inventor(es):

PETER BO JOAKIM ELLMARK **SE**

EVA MARIA DAHLEN **SE**

(74) Mandatário:

JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA

RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-CD40, SUAS UTILIZAÇÕES E MÉTODOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A ANTICORPOS (E RESPECTIVOS FRAGMENTOS, VARIANTES, FUSÕES E DERIVADOS) COM ESPECIFICIDADE DE LIGAÇÃO MULTIVALENTE AO CD40, QUE TÊM UMA POTÊNCIA PARA A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS QUE É MAIOR DO QUE, OU É IGUAL À, POTÊNCIA PARA A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS B E EM QUE O ANTICORPO, OU RESPECTIVO FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGENO, OU FUSÃO, VARIANTE OU DERIVADO, TEM UMA AFINIDADE (KD) AO CD40 DE MENOS DE 1×10^{-10} M, O QUE TEM UTILIDADE NO TRATAMENTO DE DOENÇAS TAIS COMO O CANCRO. A INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE A COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, UTILIZAÇÕES, MÉTODOS E KITS QUE COMPREENDEM TAIS ANTICORPOS.

RESUMO

ANTICORPOS ANTI-CD40, SUAS UTILIZAÇÕES E MÉTODOS

A presente invenção refere-se a anticorpos (e respectivos fragmentos, variantes, fusões e derivados) com especificidade de ligação multivalente ao CD40, que têm uma potência para a ativação de células dendríticas que é maior do que, ou é igual à, potência para a ativação de células B e em que o anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, ou fusão, variante ou derivado, tem uma afinidade (KD) ao CD40 de menos de 1×10^{-10} M, o que tem utilidade no tratamento de doenças tais como o cancro. A invenção também se refere a composições farmacêuticas, utilizações, métodos e kits que compreendem tais anticorpos.

DESCRIÇÃO

ANTICORPOS ANTI-CD40, SUAS UTILIZAÇÕES E MÉTODOS

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a polipeptídeos baseados em anticorpos com especificidade de ligação ao CD40, que exibem uma afinidade melhorada e/ou potência agonista, o que tem utilidade no tratamento de doenças tais como o cancro. A invenção também se refere a composições farmacêuticas, utilizações, métodos e kits que compreendem tais anticorpos.

Introdução

O cancro é responsável por mais de 30 % das mortes nos países desenvolvidos. Embora tenha sido alcançado um grande progresso no tratamento de certos tumores (doença de Hodgkin, alguns linfomas/leucemias, cancro cutâneo localizado), as terapias convencionais tais como a cirurgia, quimioterapia, e radioterapia, são frequentemente ineficazes na cura de tumores sólidos disseminados.

A imunoterapia (sinónimo de terapia biológica) do cancro é muito promissora no tratamento de vários tipos diferentes de cancro, incluindo tumores metastáticos disseminados (Stagg et al., 2007, Immunol Rev. 220:82-101; Melief, 2008, Immunity, 29:372-383; Melero et al., 2007, Nat. Rev. Cancer, 7:95-106; Waldmann, 2006, Annu. Rev Med. 57:65-81; Khawli et al., 2008, Handb. Exp. Pharmacol. 181:291-328; Berinstein, 2007, Vaccine, 25 Suppl 2: B72-B88; Mellor & Munn, 2008, Nat Rev Immunol. 8:74-80). Tem como objetivo recrutar o próprio sistema imunitário do paciente para combater o cancro e gerar uma erradicação de longo prazo das células tumorais.

Foram desenvolvidas várias abordagens diferentes à imunoterapia do cancro, incluindo as seguintes:

- (1) A terapia com anticorpos monoclonais (mAb) pode ser utilizada para: i) alvejar células cancerosas para destruição, ou utilizando os anticorpos naked (nús) ou

conjugados com uma toxina (por exemplo, Rituximab); e/ou ii) bloquear recetores do fator de crescimento (por exemplo, Herceptin®); e/ou iii) estimular o sistema imunitário.

(2) Vacinas contra o cancro, que incluem vacinas de células tumorais (autólogas ou alogénicas), vacinas antigénicas e vacinas de células dendríticas (CDs), vacinas de ADN, e vacinas baseadas em vetores (por exemplo, transferência de genes baseada em adenovírus).

(3) Imunoterapias não-específicas e adjuvantes, que agem por estimulação do sistema imunitário de forma mais geral e deste modo ativam células imunes específicas a tumores que tenham sido suprimidas pelo ambiente tumoral. Isto pode ser realizado por estimulação ou ativação de células efetoras da imunidade, originando uma reação imune ao tumor (por exemplo, células T efetoras, ou células T_{eff}), ou por inibição ou inativação de células com um fenótipo inibitório (por exemplo, células T reguladoras, ou T_{reg}). Uma abordagem como esta, irá incluir moléculas ativas tais como citocinas, adjuvantes bacterianos, assim como fármacos (incluindo mAbs) que alvejam recetores imunorregulatórios (por exemplo, CTLA-4 e CD40). Abordagens adicionais incluem transferência adotiva de células T e terapias de redução de T_{reg} , que se situam algures entre os dois últimos grupos.

O CD40 é uma glicoproteína expressa na superfície celular que pertence à superfamília dos recetores do fator de necrose tumoral (TNFr) e tem um papel central no sistema imunitário. É expressa numa variedade de células imunes, tais como células B, células dendríticas, monócitos e macrófagos. Quando ocorre sinalização através do CD40, são ativadas células apresentadoras de antígeno profissionais (CAAs) (revisto por Schonbeck e Libby, 2001, *Cell Mol Life Sci*, 58(1): 4-43).

O ligante natural do CD40, designado CD154 ou CD40L, é expresso principalmente em linfócito T maduros (Armitage et al., 1992, *Nature*, 357: 80-82; Schonbeck et al., 2001, *Cell Mol Life Sci*, 58, 40-43; van Kooten et al., 2000, *J. Leuk. Biol.*,

67: 2-17; Quezada et al., 2004, *Annu. Rev. Immunol.*, 22:3077-328). A sinalização mediada pelo CD40L despoleta vários eventos biológicos, incluindo ativação de células imunes, proliferação, e produção de citocinas e quimiocinas (Schonbeck et al., 2001, *Cell Mol Life Sci.*, 58:40-43; van Kooten et al., 2000, *J. Leuk., Biol.*, 67: 2-17).

A sinalização pelo CD40 é crítica para respostas imunes dependentes de células T e dependentes de células B, e os pacientes com CD40 ou CD40L não funcional são marcadamente imunossuprimidos (Foy et al., 1993, *J Exp Med* 5:1567-1575; Siepmann et al., 2001, *Immunology* 3:263-272; Allen et al., 1993, *Science*, 259:990-993). A estimulação de células apresentadoras de antígenos, tais como as células B humanas e células dendíticas com CD40L recombinante e anticorpos anti-CD40, induz uma suprarregulação de marcadores de superfície, tais como o CD23, CD80, CD86, Fas e MHC II, e secreção de citocinas solúveis, por exemplo, IL-12, TNF- γ e TNF- α (van Kooten et al., 2000, *J Leucoc Biol*, 67:2-17; Schonbeck et al., 2001, *supra*). No contexto de um tumor, as células dendíticas estimuladas pelo CD40 podem ativar células T efectoras específicas a tumores, que têm o potencial para erradicar células tumorais (van Kooten et al., 2000, *J Leucoc Biol*, 67:2-17; Sotomayor et al., 1999, *Nature Medicine*, 5:780-787).

A expressão do CD40 ocorre em muitas células normais e em células tumorais. Por exemplo, todos os linfomas B e 30 % até 70 % dos tumores sólidos têm expressão de CD40. Os melanomas e carcinomas pertencem aos tumores com expressão de CD40. Está bem estabelecido que a ativação do CD40 é eficaz a despoletar respostas antitumorais (Tong et al., 2003, *Cancer Gene Therapy*, 10(1):1-13; Ottalano et al., 2002, *Tumori*, 88 (5):361-6). O efeito da ativação do CD40, que contribui para o impedimento do crescimento tumoral, envolve pelo menos mecanismos de ativação imune que produzem uma resposta de células T específica a tumores, um efeito apoptótico direto em tumores

CD40-positivos, e estimulam uma resposta humoral que leva a ADCC. Também foram relatados efeitos antitumorais por ativação do CD40 em tumores CD40-negativos (Tutt et al., 2002, *J Immunol.*, 168 (6):2720-8; van Mierlo et al., 2002, *Proc Natl Acad Sci, USA*, 99(8):5561-6). Aqui, a erradicação tumoral observada estava fortemente ligada ao aparecimento de LTCs, linfócitos T citotóxicos específicos a tumores.

Foram propostos adjuvantes para a vacina do cancro, envolvendo estimulação de CD40. Foi demonstrada uma prova de conceito pré-clínica para anticorpos agonistas de CD40, em várias formas de cancro (Kalbashi et al., 2010, *J Immunotherapy*, 33:810-816; Loskog et al., 2009, *Semin Immunology*, 21:301-307; French et al., 1999, *Nature Medicine*, 5:548-553; Sotomayor et al., 1999, *Nature Medicine*, 5:780-787; Staveley et al., 2003, *Nature Medicine*, 171:697-707). Também foram realizados testes clínicos para anticorpos agonistas de CD40, incluindo o SGN-40 (um anticorpo humanizado que tem propriedades agonistas parciais e fracas) e o CP-870893 (um anticorpo monoclonal agonista de CD40, seletivo e completamente humano) (Khalil e Vonderheide, 2007, *Update on Cancer Therapeutics*, 2:61-65; Hussein et al., 2010, *Haematologica*, 95:845-848).

O documento WO 2006/073443 divulga composições e métodos para a inibição de atividades dirigidas por CD40 que são mediadas através da ligação do C4BP ao CD40. As composições aí divulgadas incluem anticorpos anti-CD40 e fragmentos de ligação ao antígeno respetivo, que são indicadas ter as seguintes características: 1) estão livres de atividade agonista ao CD40 quando ligadas ao antígeno CD40; e 2) são capazes de ligar-se especificamente ao antígeno CD40 expresso na superfície das células, em que esta ligação ao antígeno CD40 bloqueia a sinalização do CD40 mediada pelo C4BP, deste modo inibindo uma ou mais atividades dirigidas pelo CD40. Os anticorpos antagonistas anti-CD40 do documento WO 2006/073443 são utilizados para tratar doenças associadas ao CD40 que são

mediadas pela estimulação da sinalização do CD40 pelo C4BP, incluindo cânceros, tais como cânceros relacionados com células B e tumores sólidos, e doenças ou distúrbios que têm uma componente autoimune e/ou inflamatória, incluindo rejeição de órgãos e de transplante de tecidos.

No entanto, a administração sistêmica de anticorpos CD40 foi associada com efeitos secundários adversos, tais como síndrome de choque e síndrome de libertação de citocinas (van Mierlo et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:5561-5566; van Mierlo et al., 2004, J Immunol 173:6753-6759).

Tendo em conta o descrito acima, permanece a necessidade de terapias antitumorais melhoradas, particularmente anticorpos agonistas anti-CD40 adequados para utilização clínica.

Sumário da Invenção

Num primeiro aspeto, a invenção fornece um anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno com especificidade de ligação multivalente ao CD40, que compreende CDRs tal como definidas no presente documento, que retém a especificidade de ligação multivalente ao CD40, em que a potência do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno para a ativação de células dendríticas, é mais alta que, ou é igual à, sua potência para a ativação de células B, e em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma afinidade (KD) pelo CD40 de menos de 1×10^{-10} M (ou seja, 0,1 nM).

Alternativamente, ou adicionalmente, o primeiro aspeto da invenção fornece um anticorpo ou um respetivo fragmento de ligação ao antígeno, com especificidade de ligação multivalente ao CD40, que retém a especificidade de ligação multivalente ao CD40, em que o anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno, é capaz de exercer efeitos citotóxicos duplos nas células tumorais CD40⁺ (preferivelmente *in vivo*). O termo "efeitos citotóxicos duplos", inclui um efeito apoptótico direto nas células tumorais e um efeito citotóxico indireto mediado por células imunes (por exemplo, ADCC) nas células tumorais.

O termo "potência", com respeito a ativação de células dendríticas e ativação de células B, quer dizer o EC50 para uma tal ativação de células pelo anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno, ou fusão, variante ou derivado respetivo. Será apreciado pelos peritos na especialidade que a potência para ativação de células dendríticas e ativação de células B pode ser medida por diferentes métodos, incluindo, mas não limitados aos métodos descritos nos exemplos abaixo.

Numa forma de realização, a ativação de células dendríticas é definida por referência a um EC50 para a estimulação da expressão do CD80 medida por análise por FACS (tal como no Exemplo 4), e a ativação de células B é definida por referência a um EC50 para a proliferação de células B (tal como no Exemplo 6).

É sabido que o anticorpo anti-CD40 desenvolvido pela Pfizer, CP-870893, tem uma potência aproximadamente 20 vezes maior para a ativação de células B do que para a ativação de células dendríticas (Gladue et al., 2011, *Cancer Immunol Immunotherapy* (7), 1009-1017). Também foi demonstrado que um dos grandes efeitos farmacológicos do tratamento com CP-870893, é um rápido decréscimo na percentagem de células B entre os linfócitos sanguíneos periféricos (Vonderheide et al., 2007, *Journal of Clinical Oncology* 25, 7, 876-883). O efeito nas células B pode resultar numa toxicidade limitadora da dose, a uma dose de tratamento que é insuficiente para ativar células dendríticas. Os presentes inventores acreditam que a ativação de células dendríticas é de maior relevância clínica que a ativação das células B. A terapia do cancro por agonistas de CD40 está firmemente ligada à ativação de células T (French et al., 1999, *Nature Medicine*, 548-553; van Kooten et al., 2000, *J Leucoc Biol*, 67:2-17; Sotomayor et al., 1999, *Nature Medicine*, 5:780-787), e esta ativação de células T depende da ativação de células apresentadoras de antígeno profissionais, em particular células dendríticas (Melief et al., 2000, 75: 235-282).

Os presentes inventores desenvolveram clones de anticorpos anti-CD40 agonistas que têm uma capacidade melhorada de ativar células dendríticas.

Numa forma de realização, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, da invenção, têm uma potência para ativação das células dendríticas que é maior do que, ou igual à, sua potência para ativação de células B. Ou, colocado de outra forma, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, da invenção, têm uma potência para ativação de células B que é mais baixa do que, ou igual à, sua ativação de células dendríticas que é maior do que, ou igual à, sua potência para ativação de células dendríticas.

O termo "especificidade de ligação" inclui a capacidade do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, da invenção, de ligar-se pelo menos 10 vezes mais fortemente ao CD40 que a qualquer outro polipeptídeo; preferivelmente pelo menos 50 vezes mais fortemente e mais preferivelmente pelo menos 100 vezes mais fortemente. Preferivelmente, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, da invenção, liga-se seletivamente ao CD40 em condições fisiológicas (por exemplo, *in vivo*; e por exemplo, quando o CD40 está presente na superfície celular).

O termo "multivalente" inclui que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, da invenção, compreende dois ou mais locais de ligação do antígeno com especificidade de ligação ao CD40. Por exemplo, o anticorpo pode compreender dois, ou três, ou quatro, ou cinco, ou seis, ou mais, destes locais de ligação ao antígeno. Numa forma de realização, o anticorpo é um anticorpo IgG intacto, bivalente.

O CD40 é uma glicoproteína expressa na superfície celular que pertence à superfamília do recetor do fator de necrose tumoral (TNFr) e tem um papel central no sistema imunitário. É expresso numa variedade de células imunes, tais como células B, células dendríticas, monócitos, e macrófagos, e são ativadas CAAs profissionais quando ocorre sinalização através

do CD40 (reviewed by Tasci et al., 2001, Cell. Mol. Life Sci., (58), 4-43). A expressão do CD40 ocorre em muitas células normais e em células tumorais, tais como linfomas B, tumores sólidos, melanomas e carcinomas. Está bem estabelecido que a ativação do CD40 é eficaz a despoletar respostas antitumorais, e o efeito da ativação do CD40 contribui para o impedimento do crescimento tumoral, pelo menos pelos mecanismos de ativação imune, um efeito apoptótico direto em tumores CD40-positivos e a estimulação de uma resposta humoral que leva a ADCC e CDC.

A ocorrência de ADCC e CDC depende do sistema imunitário hospedeiro interagir com a parte Fc do anticorpo, que é determinado pela região constante da cadeia pesada. Das regiões constantes que ocorrem naturalmente, o gama 1 é o isótopo que evoca mais eficazmente o ADCC e o CDC (Janeway's Immunobiology, 2008, 7ª edição, Garland Science). Em conformidade, o Fc preferido para os anticorpos da invenção é um Fc gama 1, fazendo o anticorpo anti-CD40 um isotipo IgG1. Também seria possível aumentar mais estes efeitos por utilização de uma variedade de métodos conhecidos, tais com engenharia de Fc (mutações pontuais) e modificações de glicanos (revisto por Carter, Nature Reviews Immunology, 2006 (6), 343-357).

O mecanismo pelo qual os anticorpos ativam o CD40 nas células dendríticas e células B, é dependente do epítipo no CD40 ao qual se liga e da multimerização do recetor. A dimerização do recetor de CD40 pelo anticorpo bivalente exemplar (IgG1) da invenção, é vantajosa pelo seu efeito agonista.

O termo "CD40" inclui qualquer proteína natural ou sintética com identidade estrutural e/ou funcional com a proteína CD40 humana, tal como definido no presente documento e/ou variantes naturais respectivas.

Preferivelmente, o CD40 é CD40 humano, tal como o UniProt Acession N°. P25942 e GenBank Acession N°. AAH12419.

No entanto, será apreciado pelos peritos que o CD40 possa ser de qualquer mamífero, tal como um mamífero domesticado

(preverivelmente com importância agrícola ou comercial incluindo, um cavalo, porco, vaca, ovelha, cão e gato). O termo "proteína mamífera" inclui qualquer proteína encontrada em, derivada a partir de, e/ou isolada a partir de, uma ou mais células de um mamífero; por exemplo, o termo "proteína humana" inclui uma proteína encontrada em, derivada a partir de, e/ou isolada a partir de, uma ou mais células de um humano.

Tal como discutido acima, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno, da invenção, são capazes de ativar células B e células dendríticas.

As CAAs profissionais, tais como as células dendríticas, são ativadas quando ocorre sinalização através do CD40, que despoleta vários eventos biológicos, incluindo ativação de células imunes, proliferação e produção de citocinas e quimiocinas. São conhecidos na especialidade métodos para a determinação da ativação de células dendríticas (discutido, por exemplo, em Schonbeck et al., 2001, *Cell Mol Life Sci.*, 58:40-43; van Kooten et al., 2000, *J. Leuk., Biol.*, 67: 2-17) e são descritos nos Exemplos anexos.

A estimulação de células B humanas com CD40L recombinante ou anticorpos anti-CD40 induz uma suprarregulação de marcadores de superfície, tais como o CD23, CD30, CD80, CD86, Fas e MHC II, secreção de citocinas solúveis, por exemplo, IL-12, TNF- γ e TNF- α , e agregação homeotípica. São conhecidos na especialidade métodos para a determinação da ativação de células B relacionada com o CD40 (discutido, por exemplo, em Schonbeck et al., 2001, *supra*) e são descritos nos Exemplos anexos.

Os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno, da invenção, foram otimizados de forma a fornecer uma potência melhorada para a ativação de células dendríticas. Numa forma de realização, a potência para ativação de células dendríticas é aumentada seletivamente em relação à potência para a ativação de células B.

São bem conhecidos na especialidade métodos e análises

para a determinação da potência de um anticorpo para a ativação de células dendríticas e células B.

Por exemplo, a ativação de células dendríticas pode ser avaliada pela medição da suprarregulação de marcadores de superfície celular, tais como o CD86 e CD80 (ver Exemplo 3), e/ou pela medição da secreção de IFN γ de células T, induzida por anticorpos anti-CD40 (ver Exemplo 4 abaixo).

Da mesma forma, a ativação de células B pode ser avaliada pela medição da suprarregulação de marcadores de superfície celular (tal como o CD86; ver Gladue et al., 2011, *supra*) e/ou pela medição da proliferação de células B, induzida por anticorpos anti-CD40 (ver Exemplo 6 abaixo).

Os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno, da invenção, ativam células dendríticas pelo menos tão potentemente como ativam células B (por exemplo, tal como determinado pela medição da suprarregulação do CD80 e/ou CD86 das mesmas). Assim, os anticorpos e respectivos fragmentos de ligação ao antígeno, da invenção, podem ter duas vezes mais potência para a ativação de células dendríticas versus células B, por exemplo, pelo menos três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes, sete vezes, oito vezes, nove vezes, dez vezes ou mais, maior potência para a ativação de células dendríticas.

O termo "anticorpo" inclui moléculas de anticorpo substancialmente intactas, assim como anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos (em que pelo menos um aminoácido é mutado em relação aos anticorpos humanos que ocorrem naturalmente), anticorpos de cadeia única, anticorpos biespecíficos, cadeias pesadas de anticorpos, cadeias leves de anticorpos, homodímeros e heterodímeros de cadeias pesadas e/ou leves de anticorpos, e fragmentos de ligação ao antígeno e derivados do mesmo. O te também inclui moléculas tipo anticorpo que podem ser produzidas utilizando técnicas de apresentação em fagos (phage-display) ou técnicas de seleção aleatória para moléculas. O termo também inclui todas as classes de anticorpos, incluindo: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

Tal como discutido adicionalmente abaixo, também estão incluídos na invenção fragmentos de anticorpo tais como o Fab, $F(ab')_2$, Fv e outros fragmentos respetivos que retêm o local de ligação ao antígeno. De forma semelhante, o termo "anticorpo" inclui derivados geneticamente modificados de anticorpos, tais como moléculas Fv de cadeia única (FVcu) e anticorpos de domínio único (dAbs). Tais fragmentos e derivados podem ser tornados multivalentes para o CD40 por multimerização, por exemplo dímeros scFv-scFV ou dAb-dAb. Os domínios variáveis pesados (V_H) e variáveis leves (V_L) do anticorpo estão envolvidos no reconhecimento de antígenos, um facto que foi primeiramente reconhecido por experiências iniciais de digestão de protease. Foi encontrada uma confirmação adicional pela "humanização" de anticorpos de roedores. Domínios variáveis de origem roedora podem ser fundidos com domínios constantes de origem humana, de tal maneira que o anticorpo resultante retenha a especificidade antigénica do anticorpo pai do roedor (Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

Também são descritos no presente documento, variantes, fusões e derivados dos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno, da invenção, assim como fusões de ditas variantes ou derivados, desde que tais variantes, fusões e derivados tenham uma especificidade de ligação ao CD40 e uma potência para ativação de células dendríticas que seja maior do que, ou seja igual à, potência para a ativação de células B.

Como os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno compreendem uma ou mais componentes de polipeptídeo, variantes, fusões e derivados adequados do anticorpo e respetivo fragmento de ligação ao antígeno, tal como definido no presente documento, podem ser feitos por utilização dos métodos de engenharia de proteínas e mutagénese sítio-dirigida bem conhecidos na especialidade que utilizam os polinucleótidos recombinantes (ver exemplo, ver Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3ª edição, Sambrook & Russell,

2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Assim, variantes, fusões e derivados do anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, tal como definidos no presente documento, podem ser feitos baseados na componente polipeptídica do anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno.

O termo "fusão", inclui o dito polipeptídeo fundido com qualquer outro polipeptídeo. Por exemplo, o dito polipeptídeo pode ser fundido com um polipeptídeo tal como a glutathione S-transferase (GST) ou proteína A, de forma a facilitar a purificação do dito polipeptídeo. Exemplos de tais fusões são bastante conhecidos pelos peritos na especialidade. De forma semelhante, o dito polipeptídeo pode ser fundido com um marcador de oligohistidina tal como o His6, ou com um epítopo reconhecido por um anticorpo tal como o bem conhecido epítopo Myc-tag. Também estão incluídas no âmbito da invenção, fusões com qualquer variante ou derivado do dito polipeptídeo.

A fusão pode compreender ou consistir numa porção adicional que confere uma característica desejável no dito polipeptídeo; por exemplo, a porção pode ser útil na deteção ou isolamento do polipeptídeo, ou na promoção de captação celular do polipeptídeo. A porção pode ser, por exemplo, uma fração de biotina, uma fração radioativa, uma fração fluorescente, por exemplo um pequeno fluoróforo ou um fluoróforo de proteína verde fluorescente (GFP), tal como é sabido pelos peritos na especialidade. A fração pode ser um marcador imunogénico, por exemplo um Myc-tag, como é sabido pelos peritos na especialidade, ou pode ser uma molécula lipofílica ou domínio polipeptídico que seja capaz de promover a captação celular do polipeptídeo, como é sabido pelos peritos na especialidade.

O termo "variantes" do dito polipeptídeo, inclui inserções, deleções e substituições, conservativas ou não-conservativas. Em particular, incluímos variantes do polipeptídeo onde essas mudanças não alteram substancialmente

a atividade do dito polipeptídeo. As variantes podem incluir, por exemplo, variantes alélicas, que irão normalmente, diferir da sequência dada por apenas um, ou dois, ou três, e normalmente não mais do que 10 ou 20 resíduos de aminoácidos. Normalmente, as variantes têm substituições conservadoras.

A variante do polipeptídeo pode ter uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 75 % de identidade com uma ou mais sequências de aminoácidos dadas acima, por exemplo pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % de identidade com uma ou mais sequências de aminoácidos especificadas no presente documento.

Por exemplo, variantes dos polipeptídeos definidos no presente documento incluem polipeptídeos que compreendem uma sequência com pelo menos 60 % de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que compreende: SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:27; e SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:34; SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:38; e SEQ ID NO:39; e tem preferivelmente pelo menos 70 %, ou 80 %, ou 85 %, ou 90 % de identidade com a dita sequência, e mais preferivelmente pelo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade com a dita sequência.

A percentagem de identidade pode ser determinada, por exemplo, pelo programa LALIGN (Huang e Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357) nas instalações da Expasy (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html), utilizando como parâmetros a opção de alinhamento global, matrizes de pontuação BLOSUM62, penalidade para lacunas de abertura -14, penalidade para lacunas de extensão -4. Alternativamente, a percentagem de identidade de sequência entre dois polipeptídeos pode ser determinada por utilização de programas de computador, por exemplo o programa GAP do Genetic Computing Group da Universidade de Wisconsin, e será

apreciado que a percentagem de identidade é calculada em relação a polipeptídeos cuja sequência foi alinhada de forma otimizada.

O alinhamento pode alternativamente ser realizado por utilização do programa Clustal W (tal como descrito em Thompson et al., 1994, Nucl. Acid Res. 22:4673-4680). Os parâmetros utilizados podem ser os seguintes:

- Parâmetros rápidos de alinhamento de pares: tamanho da (palavra) K-tuple; 1, tamanho da janela; 5, penalidade para lacunas; 3, número de diagonais principais; 5. Método de pontuação (scoring): x por cento.
- Parâmetros de alinhamento múltiplo: penalidade para lacunas abertas; 10, penalidade para lacunas de extensão; 0,05.
- Matriz de pontuação: BLOSUM.

Alternativamente, o programa BESTFIT pode ser utilizado para determinar alinhamentos de sequências locais.

O anticorpo e fragmento de ligação ao antígeno pode compreender ou consistir de um ou mais aminoácidos que foram modificados ou derivatizados.

Os derivados químicos de um ou mais aminoácidos podem ser conseguidos por reação com um grupo lateral funcional. Tais moléculas derivatizadas incluem, por exemplo, aquelas moléculas em que grupos amina livres foram derivatizados para formar hidrocloreto de amina, grupos p-toluenossulfonil, grupos carboxibenzoxi, grupos t-butiloxycarbonil, grupos cloroacetil ou grupos formil. Podem ser derivatizados grupos carboxil livres para formar sais, ésteres metílicos e etílicos, ou outros tipos de ésteres e hidrazidas. Podem ser derivatizados grupos hidroxilo livres para formarem derivados de O-acil ou O-alquil. Também estão incluídos como derivados químicos aqueles péptidos que contêm derivados de aminoácidos que ocorrem naturalmente, dos vinte aminoácidos padrão. Por exemplo: a 4-hidroxiprolina pode ser substituída por prolina; a 5-hidroxilisina pode ser substituída por lisina; a 3-metilhistidina por ser substituído por histidina; o

homoserina pode ser substituída por serina e a ornitina por lisina. Os derivados também incluem péptidos que contenham uma ou mais adições ou deleções, desde que a atividade requerida seja mantida. Outras modificações incluídas são a amidação, acilação do amino-terminal (por exemplo, acetilação ou amidação do ácido tioglicólico), amidação do carboxil-terminal (por exemplo, com amoníaco ou metilamina) e as modificações dos terminais semelhantes.

Será adicionalmente apreciado pelos peritos na especialidade que compostos peptidomiméticos também podem ser úteis. O termo "peptidomimético" refere-se a um composto que mimetiza a conformação e características desejáveis de um péptido particular como agente terapêutico.

Por exemplo, o dito polipeptídeo inclui não apenas moléculas em que os resíduos de aminoácidos estão juntos por ligações de péptidos ($-CO-NH-$) mas também moléculas em que a ligação peptídica está invertida. Tais peptidomiméticos retroinversos podem ser feitos utilizando métodos conhecidos na especialidade, tais como por exemplo aqueles descritos em Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Esta abordagem envolve fazer pseudopeptídeos que contêm mudanças que envolvem a cadeia principal, e não a orientação de cadeias laterais. Péptidos retroinversos, que contêm ligações $NH-CO$ em vez de ligações peptídicas, são muito mais resistentes a proteólise. Alternativamente, o dito polipeptídeo pode ser um composto peptidomimético em que um ou mais dos resíduos de aminoácidos estão ligados por uma ligação $-y(CH_2NH)-$ no lugar da ligação amida convencional.

Numa alternativa adicional, a ligação peptídica pode ser completamente dispensada desde que seja utilizada uma fração de ligação adequada que retenha o espaçamento entre os átomos de carbono dos resíduos de aminoácidos; poderá ser vantajoso para a fração de ligação ter substancialmente a mesma carga de distribuição e substancialmente a mesma planaridade que uma ligação peptídica.

Será apreciado que o dito polipeptídeo pode ser bloqueado convenientemente no seu N- ou C-terminal, para ajudar a reduzir a suscetibilidade à digestão exoproteolítica.

Também foram utilizados uma diversidade de aminoácidos não-codificados ou modificados, tais como D-aminoácidos e aminoácidos N-metil, para modificar péptidos de mamíferos. Adicionalmente, pode ser estabelecida uma presumida conformação bioativa através de uma modificação covalente, tal como uma ciclização ou por incorporação da lactama ou outros tipos de pontes, por exemplo ver Veber et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2636 e Thursell et al., 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111:166.

Um tema comum entre muitas das estratégias sintéticas tem sido a introdução de alguma fração cíclica numa estrutura baseada em péptidos. A fração cíclica restringe o espaço conformacional da estrutura peptídica e isto resulta frequentemente numa especificidade aumentada do péptido para um recetor biológico particular. Uma vantagem adicional desta estratégia, é que a introdução de uma fração cíclica num péptido pode resultar também no péptido ter uma sensibilidade diminuída a peptidases celulares.

Assim, polipéptidos exemplificativos compreendem ou consistem de aminoácidos de cisteína terminal. Tal polipeptídeo pode existir numa forma cíclica heterodética pela formação de uma ligação dissulfeto dos grupos mercaptano nos aminoácidos de cisteína terminal, ou numa forma homodética pela formação de uma ligação peptídica amida entre os aminoácidos terminais. Tal como indicado acima, a ciclização de pequenos péptidos através de ligações dissulfeto ou amida entre as cisteínas N- e C-terminal podem circundar problemas de especificidade e meia-vida, às vezes observados com péptidos lineares, decrescendo a proteólise e também aumentando a rigidez da estrutura, o que pode produzir compostos com especificidade mais elevada. Os polipeptídeos ciclizados por ligações dissulfeto têm terminais amino e carboxi livres, que

podem ser ainda suscetíveis a degradação proteolítica, enquanto péptidos ciclizados por formação de uma ligação amida entre a amina N-terminal e o carboxil C-terminal já não contêm terminais amino e carboxi livres. Assim, os péptidos podem ser ligados por uma ligação C-N ou ligação dissulfeto.

A presente divulgação não está limitada de forma alguma pelo método de ciclização de péptidos, mas engloba péptidos cuja estrutura cíclica pode ser alcançada por qualquer método de síntese adequado. Assim, ligações heterodéticas podem incluir, mas não estão limitadas a formação através de pontes dissulfeto, alquilenos ou sulfeto. Métodos de síntese de péptidos homodéticos cíclicos e péptidos heterodéticos cíclicos, incluindo pontes dissulfeto, sulfeto e alquilenos, são divulgadas na patente dos EUA 5643872. Outros exemplos de métodos de ciclização são discutidos e divulgados na patente dos EUA 6008058.

Uma abordagem adicional à síntese de compostos peptidomiméticos cíclicos estabilizados, é a metátese de fecho de anel (MFA). Este método envolve etapas de sintetização de um precursor peptídico e de pô-lo em contato com um catalisador MFA para produzir um péptido restringido a nível conformacional. Precursores peptídicos adequados podem conter duas ou mais ligações C-C insaturadas. O método pode ser realizado por utilização de técnicas de síntese peptídica de fase sólida. Nesta forma de realização, o precursor, que está ancorado a um suporte sólido, é feito contatar com um catalisador MFA e o produto é então clivado do suporte sólido para produzir um péptido restringido a nível conformacional.

Outra abordagem, divulgada por D. H. Rich em *Protease Inhibitors*, Barrett e Selveson, eds., Elsevier (1986), foi a de desenhar mimicos peptídicos através da aplicação do conceito de análogo do estado de transição no desenho de inibidores de enzimas. Por exemplo, é sabido que o álcool secundário da estalina mimetiza o estado de transição tetraédrico da ligação fissil de amida do substrato de pepsina.

Em resumo, as modificações terminais são úteis, como é sabido, para reduzir a suscetibilidade por digestão de proteinase, e portanto, prolongar a meia-vida dos péptidos em soluções, particularmente em fluidos biológicos onde podem estar presentes protéases. A ciclização polipeptídica também é uma modificação útil, devido às estruturas estáveis formadas por ciclização e tendo em conta as atividades biológicas observadas em péptidos cíclicos.

Assim, o dito polipéptido pode ser cíclico. No entanto, o dito polipéptido pode alternativamente ser linear.

Preferivelmente, o anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno tem uma potência mais elevada para a ativação de células dendríticas que o conhecido anticorpo anti-CD40 "B44" (cujas sequências de aminoácidos são mostradas no Exemplo 10 abaixo).

O anticorpo agonista B44 tem origem na biblioteca n-CoDeR®, que é uma biblioteca de exibição de fragmentos de anticorpos humanos, e propriedade da BioInvent International AB (Söderlind et al., 2000, *Nature Biotechnol.*, 18:852-6; WO 98/32845). O anticorpo B44 tem uma constante de afinidade moderada a baixa (KD) de 1,7 nM, e potência moderada tal como determinada *in vitro* (Ellmark et al., 2002, *Immunology*, 106:456-463; Ellmark et al., 2008, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 243, 367-372). A afinidade e potência do anticorpo agonista B44 torna-o inadequado como anticorpo agonista anti-CD40 clinicamente e terapeuticamente relevante.

Mais preferivelmente, o anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno, tem um potência para a ativação de células dendríticas (medida como um EC50, tal como descrito no Exemplo 4) de pelo menos 0,5 µg/ml (ou seja, o EC50 é mais baixo ou igual a 0,5 µg/ml). Por exemplo, o anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno pode ter um EC50 para a estimulação do CD80 (tal como medido no Exemplo 4) de menos de 0,5 µg/ml, por exemplo, menos de 0,4 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,1 µg/ml, ou menos de 0,05 µg/ml.

O anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, melhorou a especificidade de ligação ao CD40 relativamente à do anticorpo B44.

No que diz respeito a especificidades de ligação dos anticorpos, o parâmetro cinético que é referido de forma mais comum é a afinidade global, normalmente expressa como a constante de dissociação (KD). Este parâmetro estático reflete a ocupação relativa de um recetor celular em equilíbrio e é relevante para administração sistémica. No entanto, durante a administração local, o anticorpo pode vazar da área do tumor local e o tempo de reação é assim limitado. Portanto, uma taxa de associação ("on-rate") alta (k_a alto) pode ser muito importante para o efeito clínico durante a administração local, dado que determina o tempo que demora ao anticorpo atingir o equilíbrio (Katakura et al., Journal of Molecular Catalysis, (28), 191-200, 2004). Adicionalmente, uma taxa de dissociação ("off-rate") lenta (k_d baixo) pode afetar a duração do tratamento, e pode servir para limitar o anticorpo à área do tumor, mimetizando assim uma exposição e toxicidade sistémicas.

São bem conhecidos na especialidade métodos para medir a afinidade global (KD) e taxa de associação (k_a) e taxa de dissociação (k_d) de uma interação (tal como uma interação entre um anticorpo e um ligante). São descritos métodos *in vitro* exemplificativos nos Exemplos anexos. Também é concebível utilizar métodos baseados em citometria de fluxo (Sklar et al., Annu Rev Biophys Biomol Struct, (31), 97-119, 2002).

Numa outra forma de realização preferida, o anticorpo, respectivo fragmento de ligação ao antígeno tem uma taxa de associação para o CD40 mais alta que a do anticorpo B44, por exemplo uma taxa de associação (k_a) superior a $2,7 \times 10^6$ Ms, e preferivelmente uma taxa de associação (k_a) superior a $3,0 \times 10^6$ Ms ; ou $4,0 \times 10^6$ Ms; ou $5,0 \times 10^6$ Ms; ou $6,0 \times 10^6$ Ms; ou $7,0 \times 10^6$ Ms; ou $8,0 \times 10^6$ Ms; $9,0 \times 10^6$ Ms; ou $1,0 \times 10^7$ Ms.

Numa outra forma de realização preferida, o anticorpo, respectivo fragmento de ligação ao antígeno tem uma taxa de dissociação para o CD40 mais baixa que a do anticorpo B44, por exemplo uma taxa de dissociação (k_d) inferior a $4,5 \times 10^{-3}$ s, e preferivelmente uma taxa de dissociação (k_a) inferior a $3,0 \times 10^{-3}$ s; ou $2,0 \times 10^{-3}$ s; ou $1,0 \times 10^{-3}$ s; ou $9,0 \times 10^{-4}$ s; ou $8,0 \times 10^{-4}$ s; ou $7,0 \times 10^{-4}$ s; ou $6,0 \times 10^{-4}$ s; ou $5,0 \times 10^{-4}$ s; ou $3,0 \times 10^{-4}$ s; ou $2,0 \times 10^{-4}$ s; ou $1,0 \times 10^{-4}$ s; ou $9,0 \times 10^{-5}$ s; ou $8,0 \times 10^{-5}$ s; ou $7,0 \times 10^{-5}$ s; ou $6,0 \times 10^{-5}$ s; ou $5,0 \times 10^{-5}$ s; ou $4,0 \times 10^{-5}$ s; ou $3,0 \times 10^{-5}$ s; ou $2,0 \times 10^{-5}$ s; ou $1,0 \times 10^{-6}$ s.

Numa forma de realização preferida, o anticorpo, respectivo fragmento de ligação ao antígeno, têm uma afinidade (KD) para o CD40 no intervalo de $1,0 \times 10^{-10}$ M até $1,0 \times 10^{-11}$ M e uma taxa de associação (k_a) para o CD40 no intervalo de $2,7 \times 10^6$ M até $1,0 \times 10^7$ M.

Normalmente, a invenção fornece um anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, com a afinidade para o CD40 localizada na superfície de uma célula.

O termo "localizado numa superfície de uma célula" inclui o significado que o CD40 está associado com a célula tal que uma ou mais regiões do CD40 estão presentes na face externa da superfície celular. Por exemplo, o CD40 pode estar inserido numa membrana plasmática da célula (ou seja, orientada como uma proteína transmembranar) com uma ou mais regiões apresentadas na superfície extracelular. Alternativamente, o CD40 pode estar no exterior da célula, com interações covalentes e/ou iónicas que o localizam a uma região específica ou regiões da superfície celular.

Assim, o termo "superfície de uma célula cancerosa" inclui o significado que o CD40 está localizado de tal maneira em relação a uma ou mais células derivadas a partir de, ou características de, uma célula cancerosa ou tumor.

Numa forma de realização, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, compreende ou consiste de um

anticorpo intacto.

Alternativamente, o anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno, compreende ou consiste de um fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir do grupo que consiste em: um fragmento Fv (tal como um fragmento Fv de cadeia única, ou um fragmento Fv ligado por dissulfeto), e um fragmento Fab-like (tal como um fragmento Fab; um fragmento Fab' ou um fragmento F(ab)₂).

Por exemplo, o fragmento de ligação ao antígeno pode compreender um scFv.

O termo "moléculas scFv", inclui moléculas em que os domínios parceiros V_H e V_L estão ligados através de um oligopeptídeo flexível.

As potenciais vantagens da utilização de fragmentos de anticorpos, em vez de anticorpos inteiros, são muitas. O tamanho mais pequeno dos fragmentos pode levar a propriedades farmacológicas melhoradas, tais como uma melhor penetração no local alvo. As funções efetoras dos anticorpos inteiros, tais como a ligação complementar, são removidas. Fragmentos de anticorpos Fab, Fv, scFv e dAb podem ser todos expressos na, e segregados a partir da, *E. coli*, permitindo assim a produção fácil de grandes quantidades dos ditos fragmentos.

Preferivelmente, o anticorpo, respetivo fragmento de ligação ao antígeno, da invenção, é uma molécula recombinante.

Apesar do anticorpo poder ser um anticorpo policlonal, é preferido que seja um anticorpo monoclonal, ou que o respetivo fragmento de ligação ao antígeno seja derivado de um anticorpo monoclonal.

Podem ser preparados anticorpos monoclonais adequados pelas técnicas conhecidas, por exemplo aquelas divulgadas em "Monoclonal Antibodies; A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) e em "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application", SGR Hurrell (CRC Press, 1982). Podem ser produzidos anticorpos policlonais que sejam poliespecíficos ou monoespecíficos. É preferido que sejam monoespecíficos.

Preferivelmente, o anticorpo, respectivo fragmento de ligação ao antígeno, é humano ou humanizado.

Os anticorpos podem ser anticorpos humanos no sentido em quem têm sequências de aminoácidos de anticorpos humanos com especificidade pela proteína CD40 definida no presente documento, no entanto será apreciado que poderão ser preparados utilizando-se métodos conhecidos na especialidade que não requerem imunização de humanos. Por exemplo, os polipeptídeos de anticorpos podem ser produzidos *in vitro* numa linha celular humana ou não-humana. Alternativamente, estão disponíveis ratos transgênicos que contêm, essencialmente, genes de imunoglobulina humana (ver Vaughan et al., (1998) Nature Biotechnol. 16, 535-539).

Anticorpos não-humanos adequadamente preparados, podem ser "humanizados" por formas conhecidas, por exemplo por inserção das regiões CDR de anticorpos de rato na estrutura de anticorpos humanos.

Anticorpos quiméricos são discutidos por Neuberger et al, (1998, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799).

Será apreciado pelos peritos na especialidade que a especificidade de ligação de um anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, é conferido pela presença de regiões determinantes de complementaridade (CDRs) dentro das regiões variáveis das cadeias pesadas e leves constituintes. Tal como discutido acima, numa forma de realização particularmente preferida dos anticorpos e respectivos fragmentos de ligação ao antígeno, a especificidade de ligação pelo CD40 é conferida pela presença de uma ou mais sequências do aminoácido CDR definidas no presente documento.

O termo "aminoácido" tal como utilizado no presente documento, inclui os vinte aminoácidos padrão geneticamente codificados e os seus estereoisómeros correspondentes na forma 'D' (comparado com a forma natural 'L'), aminoácidos ômega, outros aminoácidos que ocorram naturalmente, aminoácidos

não-convencionais (por exemplo, aminoácidos α,α -disubstituídos, aminoácidos N-alquila, etc.) e aminoácidos derivatizados (ver abaixo).

Quando um aminoácido esteja a ser especificamente enumerado, tal como "alanina" ou "Ala" ou "A", o termo refere-se a L-alanina e D-alanina, a não ser que seja explicitamente declarado de outro modo. Outros aminoácidos não-convencionais podem também ser componentes adequados para polipeptídeos da presente invenção, desde que a propriedade funcional desejada seja mantida pelo polipeptídeo. Para os péptidos mostrados, cada resíduo de aminoácido codificado, onde apropriado, é representado por uma designação com uma única letra, que corresponde ao nome trivial do aminoácido convencional.

Numa forma de realização, os polipeptídeos tal como definidos no presente documento, compreendem ou consistem de L-aminoácidos.

O anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia leve variável (V_L) em que o CDR1 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos:

CTGSX₁SNIGAGYX₂VY [SEQ ID NO:1]

em que:

X₁ é S ou T; e

X₂ é K ou H ou D ou G ou N.

O anticorpo ou fragmento compreende adicionalmente uma cadeia leve variável (V_L) em que o CDR2 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos:

X₃NINRPS [SEQ ID NO:2]

em que:

X₃ é G ou R.

O anticorpo ou fragmento compreende adicionalmente uma cadeia leve variável (V_L) em que o CDR3 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos:

CAAWDX₄X₅X₆X₇GLX₈ [SEQ ID NO:3]

em que:

X₄ é D ou S ou E ou G ou K; e

X₅ é S ou T ou G; e
X₆ é L ou S ou T ou L ou I; e
X₇ é S ou T ou L; e
X₈ é V ou L.

Mais preferivelmente, o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia leve variável (V_L) em que o CDR1 compreende ou consiste numa sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

CTGSTSNIGAGYKVY	[SEQ ID NO:4]; e
CTGSSSNIGAGYHVY	[SEQ ID NO:5]; e
CTGSSSNIGAGYKVY	[SEQ ID NO:6]; e
CTGSSSNIGAGYDVY	[SEQ ID NO:7]; e
CTGSSSNIGAGYGVY	[SEQ ID NO:8]; e
CTGSSSNIGAGYNVY	[SEQ ID NO:9].

Mais preferivelmente, o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia leve variável (V_L) em que o CDR2 compreende ou consiste numa sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

GNINRPS	[SEQ ID NO:10]; e
RNINRPS	[SEQ ID NO:11].

Mais preferivelmente, o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia leve variável (V_L) em que o CDR3 compreende ou consiste numa sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

CAAWDDSLGLV	[SEQ ID NO:12]; e
CAAWDSSSSGLV	[SEQ ID NO:13]; e
CAAWDESITGLV	[SEQ ID NO:14]; e
CAAWDGSLLGLV	[SEQ ID NO:15]; e
CAAWDGTLTGLL	[SEQ ID NO:17]; e
CAAWDKSISGLV	[SEQ ID NO:17]; e
CAAWDGGLLGLV	[SEQ ID NO:18].

Em formas de realização da invenção particularmente preferidas, o anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno, compreende uma cadeia leve variável (V_L) que compreende os seguintes CDRs:

- (i) SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3; ou
- (ii) SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:12; ou
- (iii) SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:13; ou
- (iv) SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:12; ou
- (v) SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:14; ou
- (vi) SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:15; ou
- (vii) SEQ ID NO:8 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:16; ou
- (viii) SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:17; ou
- (ix) SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:12; ou
- (x) SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:18.

Em ainda uma forma de realização adicional, o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia leve variável (V_L) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22;
 SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:26; e
 SEQ ID NO:27.

Numa forma de realização, o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia leve constante (C_L) que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:63.

O anticorpo ou fragmento compreende adicionalmente uma cadeia pesada variável (V_H) em que o CDR1 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de:

GFTFSTYGMH [SEQ ID NO:28]

O anticorpo ou fragmento compreende adicionalmente uma cadeia pesada variável (V_H) em que o CDR2 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de:

GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO:29]

O anticorpo ou fragmento compreende adicionalmente uma cadeia pesada variável (V_H) em que o CDR3 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de:

CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO:30]

Numa forma de realização da invenção particularmente preferida, o anticorpo ou fragmento compreende adicionalmente uma cadeia pesada variável (V_H) que compreende as CDRs da

SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30.

Numa forma de realização preferida adicional, o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia pesada variável (V_H) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:34;
SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:38; e
SEQ ID NO:39.

Numa forma de realização, o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia pesada constante (C_H) que compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:62.

É particularmente preferido que o anticorpo ou fragmento compreenda as seguintes CDRs:

- (i) SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou
- (ii) SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:12 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou
- (iii) SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou
- (iv) SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:12 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou
- (v) SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:14 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou
- (vi) SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:15 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou
- (vii) SEQ ID NO:8 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:16 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou
- (viii) SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou
- (ix) SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:12 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou
- (x) SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:18 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30.

Numa forma de realização, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, da invenção, liga-se a um epítopo no

primeiro domínio (D1) do CD40 (preferivelmente, CD40 humano).

Por exemplo, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, pode competir pela ligação ao CD40 com um ou mais dos anticorpos exemplificativos da invenção (ver Quadro A; tal como descrito nos Exemplos abaixo):

Quadro A

Anticorpos exemplificativos da invenção (regiões variáveis)		
Anticorpo exemplificativo	Sequência de aminoácidos	
	V _L	V _H
A4	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:31
A5	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:32
C4	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:33
G4	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:34
F6	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:35
F9	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:36
G12	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:37
H12	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:38
B9 e H11	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:39

Assim, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, pode ligar-se ao mesmo epítipo de CD40 como um ou mais dos anticorpos exemplificativos da invenção.

Numa forma de realização preferida, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno da invenção, compreende os pares V_L e V_H de um dos anticorpos exemplificativos da invenção (tal como mostrado no Quadro A).

Assim, numa forma de realização particularmente preferida, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, compreende uma cadeia leve variável (V_L) e uma cadeia pesada variável (V_H) que compreendem as seguintes sequências de aminoácidos:

- (i) SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:31; ou
- (ii) SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:32; ou
- (iii) SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:33; ou

- (iv) SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:34; ou
- (v) SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:35; ou
- (vi) SEQ ID NO:24 e SEQ ID NO:36; ou
- (vii) SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:37; ou
- (viii) SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:38; ou
- (ix) SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:39.

Preferivelmente, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, compreende uma região Fc de anticorpos. Será apreciado pelo perito na especialidade que a porção Fc pode ser de um anticorpo IgG, ou de uma classe diferente de anticorpos (tais como IgN, IgA, IgD ou IgE). Por exemplo, a região Fc pode ser de um anticorpo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. No entanto, vantajosamente, a região Fc é de um anticorpo IgG1.

A região Fc pode ocorrer naturalmente (por exemplo parte de um anticorpo endogenamente produzido) ou pode ser artificial (por exemplo, compreendendo uma ou mais mutações pontuais relativamente a uma região Fc que ocorra naturalmente). Podem ser vantajosas regiões Fc com mutações pontuais que melhorem a sua capacidade de ligar FcR, por exemplo, alterando a meia-vida do soro ou melhorando a ligação a recetores Fcγ (FcγR) envolvidos em ADCC e CDC. Em particular, mutações que melhoram a ligação ao FcγRIIB, por exemplo, a S267E (Strohl et al., 2009, Curr Opin Biotechnol, 20:685-691) podem ser vantajosas para a invenção dando a relação entre ligação do FcγRIIB e a atividade funcional de anticorpos CD40 (Li et al., 2011, Science, 333:1030-1034).

Numa forma de realização, a região Fc compreende ou consiste na sequência de aminoácidos SEQ ID NO:62.

É preferido que o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, da invenção, seja uma molécula IgG, ou seja um fragmento de ligação ao antígeno de uma molécula IgG. A sequência de aminoácidos de uma sequência IgG particularmente preferida, é descrita nos Exemplos anexos.

Numa forma de realização, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, da invenção, compreende

adicionalmente uma fração citotóxica, que pode ser diretamente e/ou indiretamente citotóxica.

O termo "diretamente citotóxica", inclui o significado que a fração é uma que por si só é citotóxica. O termo "indiretamente citotóxica" inclui o significado que a fração é uma que, apesar dela própria não ser citotóxica, pode induzir citotoxicidade, por exemplo pela sua ação numa molécula adicional ou por ação adicional nela.

Convenientemente, a fração citotóxica é citotóxica quando é intracelular e, preferivelmente, não é citotóxica quando é extracelular.

Preverivelmente, a invenção fornece um anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno, em que a fração citotóxica é um agente quimioterapêutico diretamente citotóxico. Opcionalmente, a fração citotóxica é um polipeptídeo diretamente citotóxico. Os agentes quimioterapêuticos citotóxicos são bem conhecidos na especialidade.

Agentes quimioterapêuticos citotóxicos, tais como agentes anticâncer, incluem: agentes alquilantes incluindo mostardas de azoto tais como mecloretamina (HN_2), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano (L-sarcolisina) e clorambucila; etileniminas e metilmelaminas tais como hexametilmelamina, tiotepa; alquilsulfonatos tais como bussulfano; nitrosureias tais como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU) e estreptozocina (estreptozotocina); e triazenos tais como dacarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazol-carboxamida); Antimetabolitos incluindo análogos de ácido fólico tais como metotrexato (ametofterina); análogos de pirimidina tais como flucrouracila (5-fluorouracil; 5-FU), floxuridina (fluorodeoxiuridina; FdUR) e citarabina (citosina arabinosida); e análogos de purina e inibidores relacionados tais como mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) e pentostatina (2'-deoxicoformicina). Produtos naturais

incluindo alcaloides da vinca tais como vinblastina (VLB) e vincristina; epipodofilotoxinas tais como etoposida e teniposida; antibióticos tais como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorrubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) e mitomicina (mitomicina C); enzimas tais como L-asparaginase; e modificadores de resposta biológica tais como alfenomas de interferão. Agentes diversos incluindo complexos de coordenação de platina tais como cisplatina (cis-DDP); antracenediona tais como mitoxantrona e antraciclina; ureia substituída tais como hidroxiiureia; derivado de metilhidrazina tal como procarbazina (N-metilhidrazina, MIH); e supressor adrenocortical tal como mitotano (o, p'-DDD) e aminoglutetímida; taxol e análogos/derivados; e agonistas/antagonistas de hormonas tais como flutamida e tamoxifeno.

Vários destes agentes foram anteriormente ligados a anticorpos e a outros agentes de entrega no local alvo, e por isso anticorpos da invenção que compreendam estes agentes podem ser prontamente feitos pelo perito na especialidade. Por exemplo, a conjugação de carbodiimida (Bauminger & Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* 70, 151-159) pode ser utilizada para conjugar uma variedade de agentes, incluindo a doxorrubicina, com anticorpos e péptidos.

As carbodiimidas compreendem um grupo de compostos que têm a fórmula geral $R_1-N=C=N-R_2$ onde R_1 e R_2 podem ser alifáticos ou aromáticos, e são utilizados para a síntese de ligações peptídicas. O procedimento preparatório é simples, relativamente rápido, e é realizado sob condições ligeiras. Os compostos de carbodiimida atacam grupos carboxílicos para os transformar em locais reativos a grupos amina livres.

A carbodiimida solúvel em água, a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) é particularmente útil para conjugar uma fração funcional com uma fração de ligação e pode ser utilizada para conjugar

doxorubicina com péptidos guiados para tumores. A conjugação de doxorubicina e uma fração de ligação requer a presença de um grupo amina que é fornecido pela doxorubicina, e um grupo carboxilo que é fornecido pelo anticorpo.

Adicionalmente à utilização de carbodiiminas para a formação direta de ligações peptídicas, a EDC também pode ser utilizada para preparar ésteres ativos tais como o éster de N-hidroxissuccinimida (NHS). O éster NHS, que se liga apenas a grupos amina, pode então ser utilizado para induzir a formação de uma ligação amídica com o único grupo amina da doxorubicina. A utilização de EDC e NHS em combinação é normalmente utilizada para conjugação, de forma a aumentar o rendimento de uma formação conjugada (Bauminger & Wilchek, *supra*, 1980).

Também podem ser utilizados outros métodos para conjugar uma fração citotóxica com anticorpos. Por exemplo, pode ser utilizada a oxidação de periodato de sódio, seguida de alquilação redutiva de reagentes apropriados, assim como reticulação com glutaraldeído.

No entanto, é reconhecido que, independentemente de que método seja selecionado para produzir um conjugado da invenção, deve ser feita uma determinação de que o anticorpo mantém a sua capacidade de alvejamento e que a fração funcional mantém a sua função relevante.

Numa forma de realização da invenção, a fração citotóxica é um péptido citotóxico ou uma fração polipeptídica em que se inclui qualquer fração que leve à morte celular. Péptidos citotóxicos e frações polipeptídicas são bem conhecidos na especialidade e incluem, por exemplo, ricina, abrina, exotoxina de *Pseudomonas*, fator tissular e semelhantes. Também são conhecidos na especialidade métodos para os ligar a frações de alvejamento, tais como anticorpos. A utilização de ricina como um agente citotóxico é descrita em Burrows & Thorpe (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8996-9000, e a utilização de fator tissular, que leva a coagulação sanguínea localizada e enfarte de um tumor, foi descrita por Ran et al., (1998) *Cancer*

Res. 58, 4646-4653 e Huang et al., (1997) Science 275, 547-550. O artigo Tsai et al., (1995) Dis. Colon Rectum 38, 1067-1074, descreve a cadeia abrina A conjugada com um anticorpo monoclonal. Outras proteínas inativadoras de ribossomas são descritas como agentes citotóxicos no documento WO 96/06641. A exotoxina de *Pseudomonas* também pode ser utilizada como uma fração de polipeptídeo citotóxico (ver, por exemplo, Aiello et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10457-10461).

Certas citocinas, tais como o TNF α e o IL-2 também poderão ser úteis como agentes citotóxicos.

Certos átomos radioativos também podem ser citotóxicos se entregues em doses suficientes. Assim, a fração citotóxica pode compreender um átomo radioativo que, em utilização, entrega uma quantidade suficiente de radioatividade ao local alvo de forma a ser citotóxico. Átomos radioativos adequados incluem o fósforo-32, iodo-125, iodo-131, índio-111, rênio-186, rênio-188 ou ítrio-90, ou qualquer outro isótopo que emita energia suficiente para destruir células vizinhas, organelos ou ácido nucleico. Preferivelmente, os isótopos e densidade dos átomos radioativos nos agentes da invenção, são tais que seja entregue ao sítio alvo uma dose de mais de 4000 cGy (preferivelmente pelo menos 6000, 8000 ou 10000 cGy) e, preferivelmente, às células no sítio alvo e aos seus organelos, particularmente o núcleo.

O átomo radioativo pode estar ligado ao anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno, variante, fusão ou derivado respetivo por formas conhecidas. Por exemplo o EDTA ou outro agente quelante pode estar ligado à fração de ligação e ser utilizado para ligar ^{111}In ou ^{90}Y . Os resíduos de tirosina podem ser diretamente marcados com ^{125}I ou ^{131}I .

A fração citotóxica pode ser um polipeptídeo indiretamente citotóxico adequado. Numa forma de realização particularmente preferida, o polipeptídeo indiretamente citotóxico é um polipeptídeo que tem atividade enzimática e pode converter um pró-fármaco não-tóxico e/ou relativamente

não-tóxico, num fármaco citotóxico. Com anticorpos, este tipo de sistema é frequentemente referido como ADEPT (TPEDA-Terapia de Pró-fármacos com Enzimas Dirigidas por Anticorpos). O sistema requer que o anticorpo coloque a porção enzimática no local desejado no corpo do paciente e após dado tempo para a enzima se colocar no local, administrar-se um pró-fármaco que seja um substrato da enzima, sendo o produto final da catálise um composto citotóxico. O objetivo da abordagem é o de maximizar a concentração do fármaco no local desejado e o de minimizar a concentração de fármaco nos tecidos normais (ver Senter, P.D. et al., (1988) "Anti-tumour effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4842-4846; Bagshawe (1987) Br. J. Cancer 56, 531-2; e Bagshawe, K.D. et al., (1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" Br. J. Cancer. 58, 700-703).

Numa forma de realização preferida, a fração citotóxica é capaz de converter um pró-fármaco não-citotóxico num fármaco citotóxico.

A enzima e pró-fármaco do sistema que utiliza uma enzima marcada tal como descrito no presente documento, pode ser qualquer uma daquelas que foram anteriormente propostas. A substância citotóxica pode ser qualquer fármaco anticâncer existente tal como um agente alquilante, timidina sintetase, ribonucleótido redutase, nucleósidos quinases ou topoisomerase; ou um agente que produza morte celular por interação com qualquer outro constituinte celular. A etoposida é um exemplo de um inibidor de topoisomerase.

Sistemas pró-fármaco relatados incluem: um pró-fármaco de mostarda de fenol ativado por uma β -glucuronidase de *E. Coli* (Wang et al., 1992 e Roffler et al., 1991); um pró-fármaco de doxorubicina ativado por uma β -glucuronidase humana (Bosslet et al., 1994); mais pró-fármacos de doxorubicina ativados por α -galactosidase de grãos de café (Azoulay et al., 1995); pró-fármacos de daunorubicina ativados por α -D-galactosidase

de grãos de café (Gesso net al., 1994); um pró-fármaco de 5-fluoridina ativado por uma β -galactosidase de *E. Coli* (Abraham et al., 1994); e pró-fármacos de metotrexato (por exemplo, metotrexato-alanina) ativados pela carboxipeptidase A (Kuefner et al., 1990, Vitols et al., 1992 e Vitols et al., 1995). Estes e outros estão incluídos no Quadro B, abaixo.

Quadro B

Enzima	Pró-fármaco
Carboxipeptidase G2	Derivados de ácido L-glutâmico e mostardas de ácido benzoico, mostardas de anilina, mostardas de fenol e mostardas de fenilonediamina; derivados fluorinados destes
Fosfatase alcalina	Fosfato de etoposida Fosfato de mitomicina
Beta-glucuronidas e	p-hidroxianilina, mostarda glucuronídeo, glucuronídeo de epirrubicina
Penicilina-V-amidase	Adriamicina-N fenoxiacetil
Penicilina-G-amidase	N-(4'-hidroxifenilacetil)palitoxina, doxorrubicina e melfalano
Beta-lactamase	Mostarda cefalosporina p-fenílenodiamina nitrogenada; derivados de doxorrubicina; vinblastina derivado de cefalosporina, mostarda de cefalosporina; um derivado de taxol
Beta-glucosidade	Ácido cianofenilmetil-beta-D-glicopiranosid urônico
Nitroredutase	5-(Azaridina-1-il)-2,4-dinitrobenzamida

Citosina deaminase	5-Fluorocitosina
Carboxipeptidase A	Metotrexato-alanina

O Quadro A é adaptado de Bagshawe (1995) Drug Dev. Res. 34, 220-230, de onde podem ser obtidas referências completas para estes vários sistemas; o derivado de taxol é descrito em Rodrigues, M.L. et al., (1995) Chemistry & Biology 2, 223.

Enzimas adequadas para formar parte de uma porção enzimática incluem: exopeptidases, tais como carboxipeptidases G, G1 e G2 (para pró-fármacos de mostarda glutamílica), carboxipeptidases A e B (para pró-fármacos baseados em MTX) e aminopeptidases (para pró-fármacos MTC 2- α -aminoacil); endopeptidases, tais como por exemplo a *thrombolysin* (para pró-fármacos de trombina); hidrolases, tais como fosfatases (por exemplo, fosfatase alcalina) ou sulfatases (por exemplo, arilsulfatases) (para fármacos fosforilados ou sulfatados); amidases, tais como penicilina amidases e arilacilamidase; lactamases, tais como β -lactamases; glicosidases, tais como β -glucuronidase (para antraciclina de β -glucuronomida), α -galactosidase (para amigdalina) e β -galactosidase (para antraciclina de β -galactose); deaminases, tais como desaminase de citosina (para 5FC); quinases, tais como uroquinase e timidina quinase (para o ganciclovir); redutases, tais como nitroreductase (para CB1954 e análogos), azoreductase (para mostardas de azobenzeno) e DT-diaforase (para CB1954); oxidases, tais como glicose oxidase (para glicose), xantina oxidase (para xantina) e lactoperoxidase; DL-racemases, anticorpos catalíticos e ciclodextrinas.

Preferivelmente, o pró-fármaco é relativamente não-tóxico comparado com o fármaco citotóxico. Normalmente, tem menos de 10 % da toxicidade, preferivelmente menos de 1 % da toxicidade tal como medida num teste de citotoxicidade *in*

vitro adequado.

É provável que a fração que é capaz de converter um pró-fármaco num fármaco citotóxico estará ativa em isolamento do resto do agente da invenção, mas é apenas necessário que esteja ativa quando (a) está em combinação com o resto do agente da invenção e (b) o agente da invenção está ligado a, adjacente a, ou internalizado em, células alvo.

Quando cada fração é um polipeptídeo, as duas porções podem estar ligadas uma com a outra por quaisquer das formas convencionais de reticulação de polipeptídeos, tais como aqueles geralmente descritos em O'Sullivan et al., (1979) Anal. Biochem. 100, 100-108. Por exemplo, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, pode ser enriquecido com grupos tiol e a fração adicional feita reagir com um agente bifuncional capaz de reagir com esses grupos tiol, por exemplo o éster de N-hidroxissuccinimida do ácido iodoacético (NHIA) ou o N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP). As ligações amídicas e de tioéteres, por exemplo conseguidas com éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida, são geralmente mais estáveis *in vivo* que ligações dissulfeto.

Alternativamente, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, pode ser produzido como um composto de fusão por técnicas de ADN recombinante, em que uma extensão do ADN compreende regiões respectivas que codificam as duas frações do agente da invenção, tanto adjacentes uma à outra ou separadas por uma região que codifica um péptido de ligação que não destrói as propriedades desejadas do agente. Concebivelmente, as duas porções do agente podem sobrepor-se completamente ou parcialmente.

A fração citotóxica pode ser um rádio-sensibilizante. Os radiosensibilizantes incluem fluoropirimidinas, análogos da timidina, hidroxiureia, gencitabina, fludarabina, nicotinamida, pirimidinas halogenadas, 3-aminobenzamida, 3-aminobenzodiamida, etanixadole, pimonidazole e misonidazole (ver, por exemplo, McGinn et al., (1996) J. Natl. Cancer Inst.

88, 1193-11203; Shewach & Lawrence (1996) Invest. New Drugs 14, 257-263; Horsman (1995) Acta Oncol. 34, 571-587; Shenoy & Singh (1992) Clin. Invest. 10, 533-551; Mitchell et al., (1989) Int. J. Radiat. Biol. 56, 827-836; Iliakis & Kurtzman (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 1235-1241; Brown (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 987-993; Brown (1985) Cancer 55, 2222-2228).

Além disso, a entrega de genes nas células pode rádiossensibilizá-las, por exemplo a entrega do gene p53 ou ciclina D (Lang et al (1998) J. Neurosurg. 89, 125-132; Coco Martin et al., (1999) Cancer Res. 59, 1134-1140).

A fração adicional pode ser uma que se torna citotóxica, ou que liberta uma fração citotóxica, quando irradiada. Por exemplo, o isótopo de boro 10, quando apropriadamente irradiado, liberta partículas α que são citotóxicas (por exemplo, ver a patente dos EUA 4348376 para Goldenberg; Primus et al., (1996) Bioconj. Chem. 7, 532-535).

Similarmente, a fração citotóxica pode ser uma que é útil em terapia fotodinâmica, tal como a Photofrin (ver, por exemplo, Dougherty et al., (1998) J. Natl. Cancer Inst. 90, 889-905).

A fração adicional pode compreender uma molécula de ácido nucleico que é diretamente ou indiretamente citotóxica. Por exemplo, a molécula de ácido nucleico pode ser um oligonucleótido antisenso que, após localização no local alvo, é capaz de entrar em células e levar à sua morte. O oligonucleótido, portanto, pode ser um dos que previne a expressão de um gene essencial, ou um que leva a uma mudança na expressão gênica que causa apoptose. Alternativamente, a fração citotóxica é uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo diretamente e/ou indiretamente citotóxico.

Exemplos de oligonucleótidos adequados incluem aqueles dirigidos ao bcl-2 (Ziegler et al., (1997) J. Natl. Cancer Inst. 89, 1027-1036), e à ADN polimerase α e topoisomerase II α (Lee et al., (1996) Anticancer Res. 16, 1805-1811).

Os ácidos nucleicos de péptidos podem ser úteis, em vez de ácidos nucleicos convencionais (ver Knudsen & Nielsen (1997) *Anticancer Drugs* 8, 113-118).

Numa forma de realização adicional, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, pode estar compreendido num veículo de entrega, para a entrega de ácido nucleico ao alvo. O veículo de entrega pode ser qualquer veículo de entrega adequado. Pode ser, por exemplo, um lipossoma que contém ácido nucleico, ou pode ser um vírus ou uma partícula semelhante a vírus que seja capaz de entregar ácido nucleico. Nestes casos, a molécula a ser entregue está normalmente presente na superfície do veículo de entrega. Por exemplo, um fragmento de anticorpo adequado pode estar presente na superfície externa de um lipossoma e o ácido nucleico a ser entregue pode estar presente no interior do lipossoma. Como outro exemplo, um vetor viral, tal como um vetor retroviral ou adenoviral, é construído de maneira a que a fração de ligação está ligada a, ou localizada na superfície da partícula viral, permitindo assim que a partícula viral seja dirigida para o local desejado. Também são conhecidos sistemas de entrega dirigidos, tais como os sistemas de adenovírus modificados descritos no documento WO 94/10323 em que, tipicamente, o ADN é transportado dentro do adenovírus, ou numa partícula semelhante a adenovírus. Michael et al., (1995) *Gene Therapy* 2, 660-668, descreve uma modificação do adenovírus de forma a adicionar uma fração seletiva de células numa fibra proteica. Também estão disponíveis etrovírus dirigidos para utilização na invenção; por exemplo, podem ser contruídas sequências que conferem afinidades de ligação específicas em genes virais env preexistentes (ver Miller & Vile (1995) *Faseb J.* 9, 190-199 para uma revisão deste e outros vetores dirigidos para terapia genética).

Podem ser utilizados imunolipossomas (lipossomas dirigidos com anticorpos). Para a preparação de imunolipossomas, é sintetizado

MPB-PE (N-[4-(p-maleimidofenil)-butiril]-fosfatidiletanolamina) de acordo com o método de Martin & Papahadjopoulos (1982) J. Biol. Chem. 257, 286-288. O MPB-PE é incorporado nas bicamadas lipossomais para permitir um acoplamento covalente do anticorpo, ou respetivo fragmento, à superfície lipossomal. O lipossoma é convenientemente carregado com o ADN ou outro construto genético para entrega nas células alvo, por exemplo, pela formação dos ditos lipossomas numa solução de ADN ou outro construto genético, seguido de uma extrusão sequencial através de filtros de membrana de policarbonato com 0,6 μ m e 0,2 μ m de tamanho dos poros, sob pressões de azoto até 0,8 MPa. Após extrusão, o construto de ADN apanhado é separado do construto de ADN livre por ultracentrifugação a 80000 $\times$ g durante 45 min. Os MPB-PE-lipossomas recentemente preparados em tampão desoxigenado, são misturados com anticorpo recentemente preparado (ou respetivo fragmento) e as reações de acoplamento são realizadas numa atmosfera de azoto a 4 °C sob rotação de uma ponta à outra constante, de um dia para o outro. Os imunolipossomas são separados de anticorpos não conjugados por ultracentrifugação a 80000 $\times$ g durante 45 min. Os imunolipossomas podem ser injetados de forma intraperitoneal ou diretamente no tumor.

O ácido nucleico entregue no local alvo pode ser qualquer ADN adequado que leve, diretamente ou indiretamente, a citotoxicidade. Por exemplo, o ácido nucleico pode codificar um ribossoma que seja citotóxico para a célula, ou pode codificar uma enzima que seja capaz de converter um pró-fármaco substancialmente não-tóxico num fármaco citotóxico (este último sistema é por vezes chamado GDEPT: Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy (TPEDG - Terapia de Pró-fármacos com Enzimas Dirigidas por Genes)).

Ribossomas que podem ser codificados no ácido nucleico para serem entregues no alvo, são descritos em Cech e Herschlag "Site-specific cleavage of single stranded DNA" patente dos EUA 5180818; Altman et al "Cleavage of targeted RNA by RNase

F" patente dos EUA 5168053, Cantin et al., "Ribozyme cleavage of HIV-1 RNA" patente dos EUA 5149796; Cech et al., "RNA ribozyme restriction endoribonucleases and methods", patente dos EUA 5116742; Been et al "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endonucleases and methods", patente dos EUA 5093246; and Been et al "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endoribonucleases and methods; cleaves single-stranded RNA at specific site by transesterification", patente dos EUA 4987071. Alvos adequados para ribossomas incluem fatores de transcrição tais como c-fos e c-myc, e bcl-2. Durai et al., (1997) Anticancer Res. 17, 3307-3312, descreve um ribossoma em cabeça de martelo contra o bcl-2.

O documento EP 0415731 descreve o sistema GDEPT. Considerações semelhantes em relação à escolha de enzima e pró-fármaco, aplicam-se ao sistema GDEPT, assim como ao sistema ADEPT descritos acima.

O ácido nucleico entregue ao local alvo pode codificar um polipeptídeo diretamente citotóxico.

Alternativamente, a fração adicional pode compreender um polipeptídeo ou polinucleótido que codifica um polipeptídeo que não é diretamente ou indiretamente citotóxico, mas tem um benefício terapêutico. Exemplos de tais polipeptídeos incluem citocinas proliferativas ou anti-inflamatórias, e fatores antiproliferativos, imunomodulatórios ou que influenciam a coagulação de sangue, o que pode ser um benefício em medicina, por exemplo no tratamento do cancro.

A fração adicional pode utilmente ser um inibidor de angiogénese, tal como os péptidos angiostatina ou endostatina. A fração adicional também pode ser utilmente uma enzima que converte um polipeptídeo precursor da angiostatina ou endostatina. As metaloproteinases de matriz humana, tais como a elastase macrófágica, gelatinase e estromelisina, convertem plasminogénio em angiostatina (Cornelius et al., (1998) J. Immunol. 161, 6845-6852). O plasminogénio é um precursor da

angiostatina.

Numa forma de realização, o anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, compreende uma fração citotóxica que compreende um átomo radioativo, por exemplo um átomo radioativo selecionado a partir do grupo que consiste em: fósforo-32; iodo-125; iodo-131; índio-111; rênio-186; rênio-188; ítrio-90.

Numa forma de realização preferida, a invenção fornece um anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, que compreende adicionalmente uma fração prontamente detetável.

O termo "fração prontamente detetável" inclui o significado de que a fração é uma que, quando localizada no local alvo, a seguir à administração do agente da invenção no paciente, pode ser detetada, normalmente de forma não-invasiva a partir do exterior do corpo, e o local do alvo ser localizado. Assim, os agentes desta forma de realização da invenção são úteis em imagiologia e diagnóstico.

Normalmente, a fração prontamente detetável é ou compreende um átomo radioativo, o que é útil em imagiologia. Átomos radioativos adequados incluem o ^{99m}Tc e o ^{123}I para estudos de cintilografia. Outras frações prontamente detetáveis incluem, por exemplo, marcadores de spin para imagem por ressonância magnética (IRM) tais como ^{123}I outra vez, ^{131}I , ^{111}In , ^{19}F , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , gadolínio, manganês ou ferro. Claramente, o agente da invenção tem de ter uma quantidade suficiente de isótopos atômicos apropriados, de forma a que a molécula seja prontamente detetada.

Os rádio-marcadores ou outros marcadores, podem ser incorporados por meios conhecidos. Por exemplo, o anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno, variante, fusão ou derivado respectivo, pode ser biossintetizado ou pode ser sintetizado por síntese química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adequados envolvendo, por exemplo, flúor-19 no lugar do hidrogénio. Marcadores tais como o ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{186}Rh , ^{188}Rh e ^{111}In podem, por exemplo, ser ligados a polipeptídeos

através de resíduos de cisteína. O ítrio-90 pode ser ligado através de um resíduo de lisina. O método IODOGEN (Fraker et al, (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49-57) pode ser utilizado para incorporar o ^{123}I . A referência ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989) descreve outros métodos em detalhe.

Preferivelmente, a fração prontamente detetável compreende um átomo radioativo, tal como, por exemplo, tecnécio-99m ou iodo-123.

Alternativamente, a fração prontamente detetável pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em: iodo-123; iodo-131; iodo-111; flúor-19; carbono-13; azoto-15; oxigénio-17; gadolínio; manganês; ferro.

Numa forma de realização preferida da invenção adicional, a fração adicional é capaz de se ligar seletivamente a uma fração diretamente ou indiretamente citotóxica, ou a uma fração prontamente detetável. Assim, nesta forma de realização, a fração adicional pode ser qualquer fração que se ligue a um composto ou componente adicional que seja citotóxico ou prontamente detetável.

A fração adicional pode, portanto, ser um anticorpo que se liga seletivamente ao composto ou componente adicional, ou pode ser alguma outra fração de ligação tal como a estreptavidina ou biotina ou semelhante. Os exemplos seguintes ilustram os tipos de moléculas que estão incluídas na invenção; outras moléculas deste tipo são prontamente aparentes dos ensinamentos do presente documento.

Um anticorpo biespecífico em que um local de ligação compreende o anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno, variante, fusão ou derivado respetivo, e o segundo local de ligação compreende uma fração que se liga a, por exemplo, uma enzima que é capaz de converter um pró-fármaco substancialmente não-tóxico num fármaco citotóxico.

Será apreciado que os anticorpos ou respetivos fragmento de ligação ao antígeno, da invenção, são reagentes úteis para

investigação e como agentes terapêuticos. Adequadamente, os anticorpos e respectivos fragmentos de ligação ao antígeno, da invenção, são marcados de forma detetável, por exemplo podem estar marcados de tal maneira que possam ser diretamente ou indiretamente detetados.

Convenientemente, os anticorpos estão marcados com uma fração radioativa, ou uma fração colorida, ou uma fração fluorescente, ou podem estar ligados a uma enzima. Normalmente, a enzima é uma que pode converter um substrato não-colorido (ou não-fluorescente) num produto colorido (ou fluorescente). O anticorpo pode estar marcado por biotina (ou estreptavidina) e ser então detetado indiretamente por utilização de estreptavidina (ou biotina), que tenha sido marcada com uma fração radioativa, ou uma fração colorida, ou uma fração fluorescente, ou semelhante, ou pode estar ligado a uma enzima do tipo descrito acima.

Preferivelmente, a fração prontamente detetável compreende um átomo radioativo, por exemplo tecnécio-99m ou iodo-123, ou um átomo radioativo selecionado do grupo que consiste em: iodo-123; iodo-131; iodo-111; flúor-19; carbono-13; azoto-15; oxigénio-17; gadolínio; manganês; ferro.

Num segundo aspeto, a invenção fornece uma molécula de ácido nucleico que codifica um anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a invenção. O termo "molécula de ácido nucleico" inclui moléculas de ADN, ADNc e ARNm, que podem ser de cadeia única ou dupla.

Preferivelmente, a molécula de ácido nucleico compreende uma ou mais sequências de nucleótidos selecionadas a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO:40; SEQ ID NO:41; SEQ ID NO:42; ou SEQ ID NO:43; ou SEQ ID NO:44; ou SEQ ID NO:45; ou SEQ ID NO:46; ou SEQ ID NO:47; ou SEQ ID NO:48; ou SEQ ID NO:49; ou SEQ ID NO:50; ou SEQ ID NO:51; or SEQ ID NO:52; ou SEQ ID NO:53; ou SEQ ID NO:54; ou SEQ ID NO:55; ou SEQ ID NO:56; ou

SEQ ID NO:57.

Ainda mais preferivelmente, a invenção fornece uma molécula de ácido nucleico que compreende as seguintes sequências de nucleótidos:

- (i) SEQ ID NO:40 e SEQ ID NO:49; ou
- (ii) SEQ ID NO:41 e SEQ ID NO:50; ou
- (iii) SEQ ID NO:42 e SEQ ID NO:52; ou
- (iv) SEQ ID NO:43 e SEQ ID NO:53; ou
- (v) SEQ ID NO:44 e SEQ ID NO:54; ou
- (vi) SEQ ID NO:45 e SEQ ID NO:55; ou
- (vii) SEQ ID NO:46 e SEQ ID NO:56; ou
- (viii) SEQ ID NO:47 e SEQ ID NO:57; ou
- (ix) SEQ ID NO:48 e SEQ ID NO:51.

Num terceiro aspeto, a invenção fornece um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico de acordo com o segundo aspeto da invenção.

Preferivelmente, o vetor é um vetor de expressão. O termo "vetor de expressão" quer dizer um que seja capaz, num hospedeiro apropriado, de expressar um polipeptídeo codificado pela molécula de ácido nucleico.

Tais vetores podem ser úteis na expressão do anticorpo codificado, fragmento de ligação ao antígeno, variante, fusão ou derivado respetivo, da invenção, numa célula hospedeira para a produção de quantidades úteis.

Foram desenvolvidos uma variedade de métodos para ligar de forma operável moléculas de ácido nucleico, especialmente ADN, a vetores, por exemplo, através de terminais coesivos complementares. Por exemplo, podem ser adicionados tratos homopoliméricos ao segmento de ADN a ser inserido no ADN do vetor. O vetor e segmento de ADN são então juntos por uma ligação de hidrogénio entre as pontas homopoliméricas complementares, para formarem moléculas de ADN recombinante.

Fragmentos de ligação sintéticos que contêm um ou mais locais de restrição, fornecem um método alternativo para juntar o segmento de ADN aos vetores. O segmento de ADN, por exemplo

gerado pela digestão com endonucleases de restrição, é tratado com polimerase de ADN de bacteriófago T4 ou polimerase I de ADN de *E. Coli*, enzimas que removem terminais salientes de cadeia simples 3' com as suas atividades exonucleolíticas 3'-5', e preenchem extremidades 3' recuadas com as suas atividades polimerizadoras.

A combinação destas atividades geram, portanto, segmentos de ADN de extremidade cega. Os segmentos de extremidade cega são então encubados com um grande excesso molar de moléculas de ligação, na presença de uma enzima que é capaz de catalisar a ligação das moléculas de ADN de extremidade cega, tais como a ligase de ADN do bacteriófago T4. Assim, os produtos da reação são segmentos de ADN que carregam sequências de ligação poliméricas nas suas extremidades. Estes segmentos de ADN são então clivados com uma enzima de restrição apropriada e ligadas a um vetor de expressão que foi clivado com uma enzima que produz terminais compatíveis com os do segmento de ADN.

Estão disponíveis comercialmente a partir de várias fontes, fragmentos de ligação sintéticos que contêm uma variedade de locais de endonucleases de restrição, incluindo a International Biotechnologies Inc., New Haven, CN, EUA.

Uma forma desejável de modificar a codificação de ADN de um polipeptídeo, é por utilização de PCR. Este método pode ser utilizado para introduzir o ADN num vetor adequado, por exemplo por manipulação em locais de restrição adequados, ou pode ser utilizado para modificar o ADN de outras formas úteis, tal como é sabido na especialidade.

Neste método, o ADN a ser enzimaticamente amplificado é flanqueado por dois iniciadores específicos que ficam eles próprios incorporados no ADN amplificado. Os iniciadores específicos podem conter locais de reconhecimento de endonucleases de restrição, que podem ser utilizados para clonar em vetores de expressão, utilizando métodos conhecidos na especialidade.

O ADN (ou no caso de vetores retrovirais, ARN) é então

expresso num hospedeiro adequado para produzir um polipeptídeo que compreende o agente da invenção. Assim, o ADN que codifica o polipeptídeo pode ser utilizado de acordo com técnicas conhecidas, modificado apropriadamente, tendo em conta os ensinamentos contidos no presente documento, para construir um vetor de expressão que é então utilizado para transformar uma célula hospedeira apropriada para a expressão e produção do polipeptídeo. Tais técnicas incluem as divulgadas nas Patentes dos EUA N°s: 4440859 concedida a 3 de abril de 1984 a Rutter et al., 4530901 concedida a 23 de julho de 1985 a Weissman, 458800 concedida a 15 de abril de 1986 a Cowl, 4677063 concedida a 30 de junho de 1987 a Mark et al., 4678751 concedida a 7 de julho de 1987 a Goeddel, 4704362 concedida a 3 de novembro de 1987 a Itakura et al., 4710463 concedida a 1 de dezembro de 1987 a Murray, 4757006 concedida a 12 de julho de 1988 a Toole, Jr. et al., 4766075 concedida a 23 de agosto de 1988 a Goeddel et al., e 4810648 concedida a 7 de março de 1989 a Stalker.

O ADN (ou no caso de vetores retrovirais, ARN) que codificam um polipeptídeo, pode ser adicionado a uma vasta variedade de outras sequências para a introdução num hospedeiro apropriado. O ADN companheiro dependerá da natureza do hospedeiro, na maneira com que o ADN é introduzido no hospedeiro, e se é desejada manutenção episomal ou integração.

Geralmente, o ADN é inserido num vetor de expressão, tal como um plasmídeo, com orientação apropriada e um quadro de leitura correto para a expressão. Se necessário, o ADN pode ser ligado às sequências nucleotídicas de controlo regulatório da transcrição e tradução apropriadas, reconhecidas pelo hospedeiro desejado, apesar de tais controlos estarem geralmente disponíveis no vetor de expressão. O vetor é então introduzido no hospedeiro através de técnicas padrão. Geralmente, nem todos os hospedeiros serão transformados pelo vetor. Portanto, será necessário selecionar para células hospedeiras transformadas. Uma técnica de seleção envolve incorporar no vetor de expressão uma sequência de DNA, com

quaisquer elementos de controle necessários, que codifica para uma característica selecionável na célula transformada, tal como resistência a antibióticos. Alternativamente, o gene para tal característica selecionável pode ser outro vetor, que é utilizado para cotransformar a célula hospedeira desejada.

As células que foram transformadas pelo vetor de expressão da invenção são então cultivadas durante tempo suficiente e sob condições apropriadas conhecidas pelos peritos na especialidade, tendo em conta os ensinamentos divulgados no presente documento, para permitir a expressão do polipeptídeo que pode então ser recuperado.

Muitos sistemas de expressão são conhecidos, incluindo bactérias (por exemplo, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*), leveduras (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), fungos filamentosos (por exemplo, *Aspergillus*), células vegetais, células animais e células de insetos.

Os vetores incluem normalmente um replicação procariota, tal como o ColE1 ori, para propagação num procariota, mesmo que o vetor seja utilizado para a expressão em outros tipos de células, não procariotas. Os vetores também podem incluir um promotor apropriado tal como um promotor procariota capaz de dirigir a expressão (transcrição e tradução) dos genes numa célula hospedeira bacteriana, tal como a *E. coli*, transformada com isto.

Um promotor é um elemento de controle de expressão formado por uma sequência de ADN que permite a ligação de polimerase de ARN e que ocorra transcrição. As sequências promotoras compatíveis com hospedeiros bacterianos exemplificativos, são normalmente fornecidas em vetores plasmídicos que contêm locais de restrição convenientes para a inserção de um segmento de ADN da presente invenção.

Vetores plasmídicos procariotas típicos, são o pUC18, pUC19, pBR322 e o pBR329 disponibilizados pela Biorad Laboratories (Richmond, CA, EUA), e o pTrc99A e pKK223-3 disponibilizados pela Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA.

Um vetor plasmídico de células mamíferas típico é o pSVL, disponibilizado pela Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA. Este vetor utiliza o promotor tardio de SV40 para dirigir a expressão de genes clonados, sendo que o nível mais alto de expressão é encontrado nas células T produtoras de antígeno, tal como as células COS-1.

Um exemplo de um vetor de expressão de mamífero induzível é o pMSG, também disponibilizado pela Pharmacia. Este vetor utiliza o promotor induzível de glicocorticoides da repetição terminal longa do vírus tumoral mamário do rato, para dirigir a expressão do gene clonado.

Vetores plasmídicos de levedura úteis são o pRS403-406 e o pRS413-416 e são geralmente disponibilizados pela Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EUA. Os plasmídeos pRS403, pRS404, pRS405 e pRS406 são plasmídeos Integrativos de Levedura (YIps - Yeast Integrating plasmids) e incorporam os marcadores seletivos de levedura *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* e *URA3*. Os plasmídeos pRS413-416 são plasmídeos com Centrômero de Levedura (Ycps - Yeast Centromere plasmids).

Outros vetores e sistemas de expressão são bem conhecidos na especialidade para utilização com uma diversidade de células hospedeiras.

Num quarto aspeto, a invenção fornece uma célula hospedeira recombinante que compreende uma molécula de ácido nucleico de acordo com o segundo aspeto da invenção, ou um vetor de acordo com o terceiro aspeto da invenção.

Preferivelmente, a célula hospedeira é uma célula bacteriana ou é uma célula de mamífero, tal como uma célula humana.

A célula hospedeira pode ser procariota ou eucariota. As células bacterianas são células hospedeiras preferidas e normalmente são uma estirpe de *E. coli* tal como, por exemplo, as estirpes *E. coli* DH5, disponibilizadas pela Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EUA, e a RR1 disponibilizada pela American Type Culture Collection (ATCC)

de Rockville, MD, EUA (Nº. ATCC 31343). Células hospedeiras eucariotas preferidas incluem células de levedura, inseto e de mamíferos, preferivelmente células de vertebrado tais como as de um rato, ratazana, macaco, ou de linhas celulares humanas fibroblásticas e dos rins. Células hospedeiras de levedura incluem a YPH499, YPH500 e YPH501 que são geralmente disponibilizadas pela Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EUA. Células hospedeiras de mamíferos preferidas incluem células de ovário do hamster chinês (OHC) disponibilizadas pela ATCC, assim como as células CRL 1658 e 293 que são células embrionárias de rim humanas. Células de inseto preferidas são as células Sf9 que podem ser transfetadas com vetores de expressão do baculovírus.

A transformação de células hospedeiras apropriadas com um construto de ADN da presente invenção é conseguida por métodos bem conhecidos que dependem normalmente do tipo de vetor utilizado. No que respeita à transformação de células hospedeiras procariotas, ver, por exemplo, Cohen et al., (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 e Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. A transformação de células de levedura é descrita em Sherman et al., (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY. O método de Beggs (1978) Nature 275, 104-109 é também útil. No que respeita a células de vertebrados, reagentes úteis na transfeção de tais células, por exemplo o fosfato de cálcio e DEAE-dextrano ou formulações de lipossomas, estão disponibilizados pela Stratagene Cloning Systems, ou pela Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EUA.

A eletroporação é também útil para a transformação e/ou transfetação de células e é bem conhecida na especialidade para a transformação de células de levedura, células bacterianas, células de inseto e células de vertebrados.

Por exemplo, muitas espécies bacterianas podem ser transformadas pelos métodos descritos em Luchansky et al.,

(1988) Mol. Microbiol. 2, 637-646. O maior número de transformantes é consistentemente recuperado após eletroporação da mistura ADN-célula, suspensa em 2,5 PEB utilizando 6250 V por cm, a 25 μ FD.

Métodos para a transformação de leveduras por eletroporação são divulgados em Becker & Guarente (1990) Methods Enzymol. 194, 182.

Células transformadas com sucesso, ou seja, células que contêm um construto de ADN da presente invenção, podem ser identificadas por técnicas bem conhecidas. Por exemplo, as células que resultam da introdução de um construto de expressão da presente invenção, podem ser cultivadas para produzir o polipeptídeo da invenção. As células podem ser recolhidas e lisadas e o seu conteúdo de ADN examinado para a presença de ADN, utilizando um método tal como o descrito por Southern (1975) J. Mol. Biol. 98, 503 ou Berent et al., (1985) Biotech. 3, 208. Alternativamente, a presença da proteína no sobrenadante pode ser detetada por utilização de anticorpos, como descrito abaixo.

Adicionalmente a analisar-se diretamente para a presença de ADN recombinante, uma transformação bem-sucedida pode ser confirmada por métodos imunológicos bem conhecidos quando o ADN recombinante é capaz de dirigir a expressão da proteína. Por exemplo, células transformadas com sucesso com um vetor de expressão, produzem proteínas que apresentam uma antigenicidade apropriada.

Amostras de células suspeitas de estarem transformadas são recolhidas e analisadas para a proteína, utilizando-se anticorpos adequados.

A célula hospedeira pode ser uma célula hospedeira dentro de um corpo animal não-humano. Assim, são incluídos animais não-humanos transgénicos que expressem um agente de acordo com a invenção (ou uma fração de ligação respetiva) por virtude da presença do transgene. Preferivelmente, o animal não-humano transgénico é um roedor, tal como um rato. Os animais

não-humanos transgênicos podem ser criados por utilização de métodos bem conhecidos na especialidade.

Num quinto aspeto, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno, da invenção, e um tampão farmacêuticamente aceitável, excipiente, diluente ou veículo.

Uma "quantidade terapêuticamente eficaz", ou "quantidade eficaz", ou "terapêuticamente eficaz", tal como utilizado no presente documento, refere-se à quantidade que fornece um efeito terapêutico para uma dada condição e regime de administração. Esta é uma quantidade predeterminada de anticorpo ativo, calculada para produzir um efeito terapêutico desejado em associação com o aditivo e diluente necessários, ou seja, um veículo ou veículo de administração. Adicionalmente, pretende-se que signifique uma quantidade suficiente para reduzir ou prevenir um défice clinicamente significativo na atividade, função e resposta do hospedeiro. Alternativamente, uma quantidade terapêuticamente eficaz é suficiente para causar uma melhoria de uma condição clinicamente significativa num hospedeiro. Tal como é apreciado pelos peritos na especialidade, a quantidade de composto pode variar dependendo da sua atividade específica. Quantidades de dosagem adequadas podem conter uma quantidade predeterminada de composição ativa, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o diluente necessário.

Uma quantidade terapêuticamente eficaz pode ser determinada por um perito normal na especialidade médica ou veterinária baseado nas características do paciente, tais como idade, peso, sexo, condição, complicações, outras doenças, etc., tal como é bem conhecido na especialidade.

Assim, o anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno pode ser formulado a várias concentrações, dependendo da eficácia/toxicidade do polipeptídeo que está a ser

utilizado. Preferivelmente, a formulação compreende o polipeptídeo ativo a uma concentração de entre 0,1 μM e 1 mM, por exemplo entre 1 μM e 500 μM , entre 500 μM e 1 mM, ou entre 300 μM e 700 μM .

No termo "farmaceuticamente aceitável" está incluído que a formulação é estéril e livre de pirógenos. Veículos farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos na especialidade de farmácia. O veículo(s) deve(m) ser "aceitável(is)" no sentido de ser(em) compatível(is) com o anticorpo da invenção e não prejudicial(is) aos recipientes respectivos. Normalmente, os veículos serão água ou solução salina que será estéril e livre de pirógenos; no entanto, podem ser utilizados outros veículos aceitáveis.

Tampões, diluentes, veículos e excipientes farmaceuticamente aceitáveis adequados, são bem conhecidos na especialidade (ver Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edição, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) e handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edição, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

Pretende-se que o termo "tampão" inclua uma solução aquosa que contém uma mistura ácido-base com o objetivo de estabilizar o pH. Exemplos de tampões são a Trizma, Bicina, Tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartarato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazolelático, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO e TES.

Pretende-se que o termo "diluente" inclua uma solução aquosa ou não-aquosa com o objetivo de diluir o agente na preparação farmacêutica. O diluente pode ser um ou mais de solução salina, água, polietilenoglicol, propilenoglicol, etanol ou óleos (tais como o óleo de cártamo, óleo de milho, óleo de amendoim, óleo de semente de algodão ou óleo de sésamo).

Pretende-se que o termo "adjuvante" inclua qualquer

composto adicionado à formulação para aumentar o efeito biológico do agente da invenção. O adjuvante pode ser um ou mais de sais de zinco, cobre ou prata, com diferentes aniões, por exemplo, mas não limitado a, fluoreto, cloreto, brometo, iodeto, tiocianeto, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartarato, e acetatos de composição acilo diferente. Os adjuvantes também podem ser polímeros catiónicos tais como éteres de celulose catiónicos, ésteres de celulose catiónicos, ácido hialurônico desacetilado, quitosana, dendrímeros catiónicos, polímeros sintéticos catiónicos tais como o polivinilimidazole, e polipeptídeos catiónicos tais como polihistidina, polilisina, poliarginina, e péptidos que contêm estes aminoácidos.

O excipiente pode ser um ou mais de carboidratos, polímeros, lípidos e minerais. Exemplos de carboidratos incluem lactose, glicose, sucrose, manitol, e ciclodextrinas, que são adicionados à composição, por exemplo para facilitar a liofilização. Exemplos de polímeros são amido, éteres de celulose, carboximetilcelulose de celulose, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, etilhidroxietilcelulose, alginatos, carrageninas, ácido hialurônico e derivados respetivos, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenoglicol/ óxido de polietileno, polietilenoóxido/ óxido de polipropileno, álcool polivinílico/ acetato de polivinilo com diferentes graus de hidrólise, e polivinilpirrolidona, todos com diferentes pesos moleculares, que são adicionados à composição, por exemplo, para controlo de viscosidade, para conseguir bioadesão, ou para proteger o lípido de degradação química ou proteolítica. Exemplos de lípidos são ácidos gordos, fosfolípidos, mono-, di-, e triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos e glicolípidos, todos com comprimentos da cadeia acila e saturação diferentes, lecitina de ovo, lecitina de soja, ovo hidrogenado e lecitina de soja, que são adicionados à composição por razões semelhantes às dos polímeros. Exemplos de minerais são o talco,

óxido de magnésio, óxido de zinco ou óxido de titânio, que são adicionados à composição para a obtenção de benefícios tais como redução da acumulação do líquido ou propriedades vantajosas do pigmento.

Os agentes ativos baseados em anticorpos da invenção podem ser formulados em qualquer tipo de composição farmacêutica conhecida na arte como sendo adequada para a respetiva entrega.

Numa forma de realização, as composições farmacêuticas da invenção podem estar na forma de um lipossoma, em que o agente é combinado, adicionalmente a outros veículos farmacêuticamente aceitáveis, com agentes anfipáticos tais como lípidos, que existem em formas agregadas como as micelas, monocamadas insolúveis e cristais líquidos. Lípidos adequados para formações lipossomais incluem, sem limitação, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatídeos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, e semelhantes. Lípidos adequados também incluem os lípidos acima modificados pelo polietilenoglicol no grupo cabeça polar para prolongar o tempo de circulação na corrente sanguínea. A preparação de tais formulações lipossomais pode ser encontrada por exemplo na patente dos EUA 4235871.

As composições farmacêuticas da invenção também podem estar na forma de microesferas biodegradáveis. Poliésteres alifáticos, tais como o ácido polilático (APL), ácido poliglicólico (APG), copolímeros do APL e APG (APLG) ou policaprolactona (PCL), e polianidridos, foram amplamente utilizados como polímeros biodegradáveis na produção de microesferas. Preparações de tais microesferas podem ser encontradas na patente dos EUA 5851451 e na patente EP 0213303.

Numa forma de realização adicional, as composições farmacêuticas da invenção são fornecidas na forma de géis poliméricos, onde polímeros tais como o amido, éteres de celulose, carboximetilcelulose de celulose, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, etilhidroxietilcelulose, alginatos, carrageninas, ácido

hialurónico e derivados respectivos, ácido poliacrílico, polivinilimidazole, polisulfonato, polietilenoglicol/ óxido de polietileno, polietilenoóxido/ copolímeros de óxido de polipropileno, álcool polivinílico/ acetato de polivinilo com diferentes graus de hidrólise, e polivinilpirrolidona, são utilizados para o espessamento da solução que contém o agente. Os polímeros também podem compreender gelatina ou colagénio.

Alternativamente, os agentes podem simplesmente ser dissolvidos em solução salina, água, polietilenoglicol, propilenoglicol, etanol ou óleos (tais como o óleo de cártamo, óleo de milho, óleo de amendoim, óleo de semente de algodão ou óleo de sésamo), goma adragante, e/ou diversos tampões.

Será apreciado que as composições farmacêuticas da invenção podem incluir iões e um pH definido para potenciação da ação do agente ativo. Adicionalmente, as composições podem ser sujeitas a operações farmacêuticas convencionais tais como esterilização e/ou podem conter adjuvantes convencionais tais como conservantes, estabilizadores, agentes de humedecimento, emulsificantes, tampões, enchimentos, etc.

As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem ser administradas por qualquer via adequada conhecida pelos peritos na especialidade. Assim, vias de administração possíveis incluem a parenteral (intravenosa, subcutânea e intramuscular), tópica, ocular, nasal, pulmonar, bucal, oral, parenteral, vaginal e retal. Também é possível administração a partir de implantes.

Vantajosamente, a composição farmacêutica é adequada para administração no ou perto do local do tumor, por exemplo, por via intratumoral ou peritumoral.

É preferido que a composição farmacêutica seja adequada para administração parenteral. Métodos para a formulação de um anticorpo numa composição farmacêutica, serão bem conhecidos pelos peritos nas especialidades de medicina e farmácia. São descritas composições preferidas nos Exemplos anexos.

Os agentes (ou seja, anticorpo ou respectivo fragmento de

ligação ao antígeno), medicamentos e composições farmacêuticas da invenção, podem ser entregues utilizando um sistema de entrega de fármacos de libertação sustentada injetável. Estes são desenhados especificamente para reduzir a frequência de injeções. Um exemplo de tal sistema é o Nutropin Depot que encapsula hormona de crescimento humana recombinante (rhGH) em microesferas biodegradáveis que, uma vez injetadas, libertam rhGH lentamente durante um período prolongado. Preferencialmente, a entrega é realizada intramuscularmente (i.m.) e/ou subcutaneamente (s.c.) e/ou intravenosamente (i.v.).

Os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção podem ser administrados por um aparelho cirúrgico que liberta o fármaco diretamente no local necessário. Por exemplo, o Vitrasert liberta ganciclovir diretamente no olho para tratar a retinite por CMV. A aplicação direta deste agente tóxico no local da doença consegue uma terapia eficaz, sem os significativos efeitos secundários sistémicos do fármaco.

Os sistemas de terapia por eletroporação (TEP) também podem ser utilizados para a administração de agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção. Um aparelho que entrega um campo elétrico pulsado em células, aumenta a permeabilidade das células ao fármaco, resultando numa melhoria significativa da entrega intracelular do fármaco.

Os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção também podem ser entregues por eletroincorporação (EI). A EI ocorre quando partículas pequenas de até 30 microns em diâmetro na superfície da pele, experimentam pulsos elétricos idênticos ou semelhantes aqueles utilizados na eletroporação. Na EI, estas partículas são dirigidas através do estrato córneo e para camadas mais profundas da pele. Estas partículas podem ser carregadas ou revestidas com fármacos ou genes, ou podem simplesmente agir como "balas" que criam poros na pele através dos quais os fármacos podem entrar.

Um método alternativo de entrega dos agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção é o sistema injetável ReGel, que é termossensível. Abaixo da temperatura do corpo, o ReGel é um líquido injetável, enquanto que à temperatura do corpo forma imediatamente um reservatório de gel que se desgasta lentamente e se dissolve em polímeros conhecidos, seguros, biodegradáveis. A substância ativa é entregue ao longo do tempo à medida que os biopolímeros se dissolvem.

Os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção também podem ser entregues oralmente. O processo utiliza um processo natural para captação oral da vitamina B₁₂ e/ou vitamina D no corpo, para coentregar proteínas e péptidos. Ao serem levados pelo sistema de captação da vitamina B₁₂ e/ou vitamina D, os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção podem mover-se através da parede intestinal. São sintetizados complexos entre análogos da vitamina B₁₂ e/ou análogos da vitamina D, e o fármaco que retém afinidade significativa pelo fator intrínseco (FI), na porção de vitamina B₁₂ / porção de vitamina D do complexo, e bioatividade significativa da substância ativa do complexo.

Os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção podem ser introduzidos em células por "péptidos Troianos". Estes são uma classe de polipeptídeos chamados penetratinas que têm propriedades de translocação e são capazes de transportar compostos hidrofílicos através da membrana plasmática. Este sistema permite um alveijamento direto do citoplasma e do núcleo por oligopeptídeos, e pode ser não-específico ao tipo de célula e altamente eficiente. Ver Derossi et al., (1998), Trends Cell Biol. 8, 84-87.

Preferivelmente, os medicamentos e/ou composições farmacêuticas da presente invenção são uma dosagem unitária que contém uma dose diária ou unidade, subdose ou uma fração apropriada respetiva, do ingrediente ativo.

Os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da

invenção irão normalmente ser administrados oralmente ou por qualquer via parenteral, na forma de uma composição farmacêutica que compreende o ingrediente ativo, opcionalmente na forma de um ácido, ou base, sal de adição, orgânico não-tóxico ou inorgânico, numa dosagem farmacêuticamente aceitável. Dependendo do distúrbio e paciente a ser tratado, assim como da via de administração, as composições podem ser administradas em doses variáveis.

Na terapia humana, os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção podem ser administrados sozinhos, mas serão geralmente administrados em mistura com um excipiente farmacêuticamente adequado, diluente ou veículo selecionado, tendo em conta a via de administração pretendida e a prática farmacêutica padrão.

Por exemplo, os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção podem ser administrados oralmente, bucalmente, ou sublingualmente na forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluções ou suspensões, que poderão conter agentes aromatizantes ou corantes, para aplicações de libertação imediata, retardada ou controlada. Os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção também podem ser administrados através de injeção intracavernosa.

Tais comprimidos podem conter excipientes tais como celulose microcristalina, lactose, citrato de sódio, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio dibásico e glicina, desintegrantes tais como o amido (preferivelmente, amido de milho, batata ou tapioca), glicolato de amido de sódio, croscarmelose de sódio e certos silicatos complexos, e ligantes de granulação tais como a polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetil (HPMC), hidroxipropilcelulose (HPC), sacarose, gelatina e acácia. Adicionalmente podem ser incluídos, agentes lubrificantes tais como o estereato de magnésio, ácido esteárico, beenato de glicerilo e talco.

Composições sólidas de um tipo semelhante, também podem

ser empregues como enchimento em cápsulas de gelatina. A este respeito, excipientes preferidos incluem a lactose, amido, celulose, açúcar de leite ou polietilenoglicóis com alto peso molecular. Para suspensões aquosas e/ou elixires, os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção podem ser combinados com vários agentes adocicantes ou aromatizantes, matéria corante ou tinturas, com agentes emulsificadores e/ou de suspensão, e com diluentes tais como a água, etanol, propilenoglicol e glicerina, e combinações respetivas.

Os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção podem ser administrados parenteralmente, por exemplo, intravenosamente, intra-arterialmente, intraperitonealmente, intratecalmente, intraventricularmente, intraesternalmente, intracranialmente, intramuscularmente ou subcutaneamente, ou podem ser administrados por técnicas de infusão. São melhor utilizados na forma de soluções aquosas estéreis que podem conter outras substâncias, por exemplo, sais suficientes ou glicose para tornar a solução isotónica com o sangue. Se necessário, as soluções aquosas devem ser tamponadas adequadamente (preferivelmente a um pH de desde 3 até 9). A preparação de formulações parenterais adequadas em condições estéreis, é prontamente conseguida por técnicas farmacêuticas padrão bem conhecidas pelos peritos na matéria.

Medicamentos e composições farmacêuticas adequadas para administração parenteral incluem soluções de injeção estéreis aquosas e não-aquosas que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostáticos e solutos, que tornam a formulação isotónica com o sangue do recipiente pretendido; e suspensões estéreis aquosas e não-aquosas que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. Os medicamentos e composições farmacêuticas podem ser apresentados em recipientes de dose única ou multidose, por exemplo ampolas e frascos selados, e podem ser armazenados numa condição de desidratação por congelação (liofilizado) requerendo apenas a adição do veículo líquido estéril, por exemplo água para injeções, imediatamente

antes de utilizar. Podem ser preparadas soluções de injeção extemporâneas e suspensões a partir de pós estéreis, grânulos e comprimidos do gênero anteriormente descritos.

Os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção também podem ser administrados intranasalmente ou por inalação, e são convenientemente entregues na forma de um inalador de pó seco ou uma apresentação de pulverização aerossol a partir de um recipiente pressurizado, bomba, pulverizador ou nebulizador com a utilização de um propelente adequado, por exemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoretano, um hidrofluoralcano tal como o 1,1,1,2-tetrafluoretano (HFA 134A4) ou 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA227EA3), dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada pelo fornecimento de uma válvula para entregar uma quantidade medida. O recipiente pressurizado, bomba, pulverizador ou nebulizador pode conter uma solução ou suspensão do agente ativo, por exemplo por utilização de uma mistura de etanol e do propelente como solvente, que pode adicionalmente conter um lubrificante, por exemplo trioleato de sorbitano. As cápsulas e cartuchos (feitas, por exemplo, de gelatina) para utilização num inalador ou insuflador podem ser formulados para conter uma mistura de pó de um agente da invenção e uma base de pó adequada, tal como lactose ou amido.

Alternativamente, os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção podem ser administrados na forma de um supositório ou pessário, ou podem ser aplicados topicamente na forma de uma loção, solução, creme, gel, pomada ou pó. Os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção também podem ser administrados transdermicamente, por exemplo pela utilização de um adesivo para a pele. Também podem ser administrados pela via ocular, particularmente para tratar doenças dos olhos.

Numa utilização oftalmológica, os agentes, medicamentos

e composições farmacêuticas da invenção podem ser formulados como suspensões micronizadas em soluções salinas estéreis, isotônicas, com pH ajustado, ou, preferivelmente como soluções em soluções salinas, estéreis isotônicas, com pH ajustado, opcionalmente em combinação com um conservante, tal como um cloreto de benzilalcônio. Alternativamente, podem ser formulados numa pomada tal como o petrolato.

Numa aplicação tópica na pele, os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção podem ser formulados como uma pomada adequada que contém o agente ativo suspenso ou dissolvido em, por exemplo, uma mistura com um ou mais dos seguintes: óleo mineral, petrolato líquido, petrolato branco, propilenoglicol, polioxetileno, agente polioxipropileno, cera emulsificante e água. Alternativamente, podem ser formulados como uma loção ou creme adequados, suspensos ou dissolvidos em, por exemplo, uma mistura de um ou mais dos seguintes: óleo mineral, monostearato de sorbitano, polietilenoglicol, parafina líquida, polissorbato 60, cera de ésteres cetílicos, álcool cetearílico, 2-octildodecanol, álcool benzílico e água.

Formulações adequadas para administração tópica na boca incluem lozengos que compreendem o ingrediente ativo numa base aromatizada, normalmente sacarose e acácia ou adragante; pastilhas que compreendem o ingrediente ativo numa base inerte, tal como gelatina e glicerina, ou sacarose e acácia; e elixires bucais que compreendem o ingrediente ativo num veículo líquido adequado.

Geralmente, em humanos, a administração dos agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção, no ou perto do local do tumor, é a via preferida, em particular uma administração intratumoral ou peritumoral.

Numa utilização veterinária, os agentes, medicamentos e composições farmacêuticas da invenção são administrados como uma formulação adequadamente aceitável de acordo com a prática veterinária normal e o cirurgião veterinário irá determinar o regime de dosagem e via de administração que será mais

apropriado para um animal particular.

Num sexto aspeto, a invenção fornece um kit que compreende uma composição farmacêutica de acordo com o quinto aspeto da invenção.

Num sétimo aspeto, a invenção fornece um anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com o primeiro aspeto da invenção, ou uma molécula de ácido nucleico de acordo com o segundo aspeto da invenção, ou um vetor de acordo com o terceiro aspeto da invenção, ou uma célula hospedeira de acordo com o quarto aspeto da invenção, ou uma composição farmacêutica de acordo com o quinto aspeto da invenção, para utilização em medicina.

Num oitavo aspeto, a invenção fornece um anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com o primeiro aspeto da invenção, ou uma molécula de ácido nucleico de acordo com o segundo aspeto da invenção, ou um vetor de acordo com o terceiro aspeto da invenção, ou uma célula hospedeira de acordo com o quarto aspeto da invenção, ou uma composição farmacêutica de acordo com o quinto aspeto da invenção, para utilização no tratamento do cancro.

Preferivelmente, no sétimo e/ou oitavo aspetos da invenção, o tratamento do cancro compreende a etapa de administração de uma quantidade eficaz de anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, ou uma variante, fusão ou derivado respetivo, ou molécula de ácido nucleico, ou vetor ou célula hospedeira, ou composição farmacêutica, a um indivíduo necessitado respetivo.

É preferido que, no sétimo e/ou oitavo aspetos da invenção, a etapa de administração a um indivíduo necessitado respetivo, compreenda administração local, por exemplo, administração local a um tumor num paciente (por exemplo, intratumoralmente ou peritumoralmente).

É sabido que tal injeção local de um anticorpo anti-CD40 num tumor, pode gerar um efeito antitumor sistémico a uma dosagem muito menor (van Mierlo et al., 2002, Proc Natl Acad

Sci USA, 99:5561-5566; Kalbasi et al., 2010, J Immunotherapy, 33:810-816). Além disso, foi reportado que ratos tratados intratumoralmente num flanco foram capazes de limpar tumores no flanco oposto, e que o efeito antitumor depende da ativação de células dendríticas, e subsequentemente ativação de uma resposta por linfócitos T citotóxicos. Adicionalmente, o tratamento produziu uma imunidade protetora a nova provocação do tumor.

Após otimização específica ao paciente da dose de anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, ou uma variante, fusão ou derivado respectivo, tal como descrito acima, é então administrado ao paciente a dose terapêutica máxima para a duração do tratamento. No entanto, será apreciado que a dose pode ser reduzida ao longo do tempo, uma vez que o tratamento comece a ter o efeito terapêutico requerido.

Normalmente, a dose terapêutica do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, ou uma variante, fusão ou derivado respectivo, num paciente humano, estará no intervalo de 100 µg a 700 mg por administração (baseado num peso corporal de 70 Kg).

Por exemplo, a dose máxima terapêutica pode estar no intervalo de 0,1 até 10 mg/kg por administração, por exemplo, entre 0,1 e 5 mg/kg ou entre 1 e 5 mg/kg ou entre 0,1 e 2 mg/kg. Será apreciado que tal dose poderá ser administrada a intervalos diferentes, como determinado pelo oncologista/médico; por exemplo, uma dose pode ser administrada diariamente, duas vezes por semana, semanalmente, quinzenalmente ou mensalmente.

Numa forma de realização, a dose terapêutica máxima do anticorpo ou respectivo fragmento de ligação ao antígeno, é uma dose baixa. Por exemplo, a dose a ser administrada localmente na presente invenção, pode ser menos de 25 % da dose sistêmica típica do mesmo agente, necessária para produzir um efeito terapêutico. Numa forma de realização, a dose é menos de ou igual a 1 mg por administração, por exemplo menos de ou igual

a 500 µg, 400 µg, 300 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg, 30 µg, 20 µg, 10 µg, 5 µg ou 1 µg por administração. Será apreciado que tais doses podem ser administradas repetidamente ao paciente ao longo do tempo, por exemplo duas vezes por dia, uma vez por dia, de dois em dois dias, duas vezes por semana, uma vez por semana, duas vezes por mês, uma vez por mês, etc..

Numa forma de realização, o(s) agente(s) baseado(s) em anticorpos, é/são para utilização com uma dose de 10 µg até 100 µg por administração.

Por exemplo, o(s) agente(s) baseado(s) em anticorpos, pode(m) ser utilizado(s) com uma dose de 20 µg até 40 µg por administração, por exemplo 30 µg por administração.

Numa forma de realização, o(s) agente(s) baseado(s) em anticorpos, é/são capazes de fornecer um efeito antitumoral sistêmico. Tal efeito antitumoral sistêmico pode ser conseguido mesmo se a terapia é feita localmente/intratumoralmente. Quando se administra um anticorpo imunoterapêutico localmente, por exemplo por injeções intratumorais, apenas células na área do tumor são alvejadas para terapia CD40. Portanto, é apenas a concentração do agonista de CD40 na área do tecido, onde se pretende que exerça os seus efeitos, que influencia o nível de ativação do CD40. Quando se administra localmente, a dose ótima pode ser determinada pelo volume da área de tecido que é relevante tratar e não o peso corporal do paciente. Quando se está a tratar intratumoralmente, este volume pode em vez disso ser definido pelo volume do tumor. A dose total relevante pode assim ser mais baixa do que a do tratamento sistêmico, e pode ser definida baseada no diagnóstico do tumor por PET ou outros métodos de imagiologia, em vez de pelo peso do paciente.

Será apreciado que os agentes baseados em anticorpos da invenção são adequados para utilização no tratamento de qualquer tipo de cancro para o qual a ativação do CD40 possa fornecer um benefício terapêutico.

Por exemplo, o cancro pode ser seleccionado a partir do

grupo que consiste em: cancro da próstata; cancro da mama; cancro colorretal; cancro pancreático; cancro dos ovários; cancro do pulmão; cancro cervical; rabdomiossarcoma; neuroblastoma; mieloma múltiplo; leucemia; leucemia linfoblástica aguda; melanoma; cancro da bexiga e glioblastoma.

Numa forma de realização, o cancro é associado com as células tumorais CD40⁺. No entanto, os agentes baseados em anticorpos da invenção podem também ser utilizados no tratamento de cancros associados com as células tumorais CD40⁻.

Será adicionalmente apreciado que os agentes baseados em anticorpos da invenção podem ser utilizados como tratamento único para o cancro num paciente, ou como parte de um tratamento combinado (em que o tratamento adicional pode ser um agente farmacêutico, radioterapia e/ou cirurgia).

Assim, o paciente também pode receber um ou mais tratamentos para o cancro, por exemplo agentes farmacêuticos (tais como agentes quimioterapêuticos) e/ou cirurgia.

Numa forma de realização, o um ou mais tratamentos são seleccionados a partir do grupo que consiste de agentes quimioterapêuticos convencionais (tais como agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetais e terpenóides, inibidores de topoisomerase e antineoplásicos), agentes radioterapêuticos, agentes terapêuticos baseados em anticorpos (tais como gemtuzumab, alemtuzumab, rituximab, trastuzumab, nimotuzumab, cetuximab, bevacizumab), e esteroides.

Também está descrito no presente documento um método para produzir um anticorpo ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a invenção, método este que compreende cultivar uma célula hospedeira de acordo com o quarto aspeto da invenção em condições que permitam a expressão do anticorpo codificado ou respetivo fragmento de ligação ao antígeno.

São bem conhecidos na especialidade métodos para cultivar células hospedeiras e isolar proteínas recombinantes. Será

apreciado que, dependendo da célula hospedeira, as proteínas produzidas podem diferir. Por exemplo, certas células hospedeiras, tal como o amido ou células bacterianas, ou não têm, ou têm sistemas diferentes de modificação pós-tradução que podem resultar na produção de formas de agentes da invenção (ou frações de ligação respectivas) que podem ser modificadas pós-tradução de uma forma diferente.

É preferido que os anticorpos ou respectivos fragmentos de ligação ao antígeno, da invenção (ou frações de ligação respectivas), sejam produzidos num sistema eucariota, tal como uma célula de mamífero.

De acordo com uma forma de realização menos preferida, os anticorpos e respectivos fragmentos de ligação ao antígeno, da invenção, podem ser produzidos *in vitro* por utilização de um sistema de tradução *in vitro* comercialmente disponível, tal como um lisado reticulócito de coelho ou lisado de gérmen de trigo (disponibilizados pela Promega). Preferivelmente, o sistema de tradução é lisado reticulócito de coelho. Convenientemente, o sistema de tradução pode ser acoplado com um sistema de transcrição, tal como o sistema de transcrição-tradução TNT (Promega). Este sistema tem a vantagem de produzir transcriptos de ARNm adequados a partir de um polinucleótido de ADN codificante, na mesma reação que a tradução.

Será apreciado que onde o agente compreenda frações distintas, por exemplo domínios de ligação e/ou citotóxicos, estas frações podem ser codificadas por um ou mais moléculas de ácido nucleico.

Preferivelmente, o método de produção compreende uma etapa adicional de isolamento dos anticorpos e respectivos fragmentos de ligação ao antígeno, da invenção, produzido a partir da célula hospedeira ou da mistura de tradução *in vitro*. Preferivelmente, o isolamento utiliza um anticorpo que liga seletivamente o polipeptídeo expresso da invenção.

São bem conhecidos na especialidade métodos para a

produção de anticorpos. Por exemplo, podem ser criados anticorpos num animal por imunização com um péptido apropriado. Alternativamente, com a tecnologia atual, é possível fazer anticorpos sem a necessidade da utilização de animais; tais técnicas incluem, por exemplo, tecnologia de exibição em fagos de anticorpos, como é bem conhecido na especialidade.

Numa forma de realização, o anticorpo e respetivo fragmento de ligação ao antígeno, da invenção, é o produto, diretamente ou indiretamente, de otimização proteica *in vitro* (por exemplo, por utilização da tecnologia FIND® da Alligator Bioscience AB, tal como descrito no documento WO 02/48351 e WO 03/097834).

A listagem ou discussão nesta especificação de um documento aparentemente publicado previamente, não deve ser tomado necessariamente como um reconhecimento que o documento seja parte do estado da técnica ou que seja de conhecimento geral comum.

Exemplos preferidos, não limitativos, que incorporam certos aspetos da invenção serão agora descritos, com referência às seguintes figuras:

Figura 1 - (A) "Mapa de calor" das bibliotecas e dos resultados das seleções de rastreio de alto rendimento (HTS - high throughput screening). Cada caixa representa uma posição de aminoácido. Os mapas de calor estão restritos a posições onde foram introduzidas mutações e/ou encontradas por análise de sequências. O ligador entre VH e VL não é apresentado. A frequência de mutação em cada posição é indicada pela sombra mais escura. (B) Número de posições com mais de 5 mutações calculadas, baseadas nas sequências do procedimento de seleção.

Figura 2 - Visualização dos resultados HTS. A razão entre as duas medições do ELISA (lavagem normal e lavagem intensa) é apresentada no eixo-y; no eixo-x, é apresentado o sinal de ligação do ELISA primário (lavagem normal). Cada esfera no gráfico representa os dados de um clone. São mostrados o B44

(cinzento) e clones da ronda de seleção número 5 (preto).

Figura 3 - Diagrama esquemático dos domínios do CD40.

Figura 4 - Análise de ressonância plasmónica de superfície dos clones do anticorpo de CD40 ligados ao alvo a 37 °C e pH fisiológico.

Figura 5 - Suprarregulação do marcador de superfície, CD86, pelos clones do anticorpo de CD40 relativamente ao anticorpo B44.

Figura 6 - É apresentado o peso dos tumores medidos no dia do ponto final (dia 28). O tratamento com 30 ug de G12 ou controlo isotópico é apresentado (**p < 0,01 para ambos os grupos de tratamento comparado com o controlo, utilizando o teste de Mann-Whitney, duas caudas).

Figura 7 - É apresentado o volume médio tumoral (n = 9) dos diferentes grupos de tratamento ($\pm$ EPM). Os ratos tratados com 30 ug de fármaco são comparados com o controlo isotópico (30 ug). O tratamento com G12 fornece um efeito antitumoral comparado como o controlo isotópico.

Figura 8 - É apresentado o peso dos tumores medidos no dia do ponto final (dia 28). O G12 é comparado com o tratamento com PBS na presença de células dendríticas humanas e células T, em que cada grupo de tratamento (n = 10) enxertou com células T autólogas e células dendríticas de dois dadores diferentes (cinco ratos para cada dador, no total de dez ratos). O tratamento com G12 é significativo comparado com o controlo isotópico (p < 0,05 para o grupo de tratamento comparado com o controlo, utilizando o teste t de Student, duas caudas).

Figura 9 - É apresentado o volume médio tumoral (n = 10) dos diferentes grupos de tratamento ($\pm$ EPM). Os ratos foram tratados com 30 ug e comparados com o tratamento com PBS na presença de células dendríticas humanas e células T, em que cada grupo de tratamento (n = 10) enxertou com células T autólogas e células dendríticas de dois dadores diferentes (cinco ratos para cada dador, no total de dez ratos). O

tratamento com G12 é significativo comparado com o controle isotípico.

Figura 10 - São mostradas curvas de sobrevivência de ratos inoculados com tumores tratados com fármaco. O tratamento com G12 aumenta significativamente a sobrevivência dos animais comparado com o controle isotípico ($p < 0,013$). A curva de sobrevivência dos ratos tratados com G12 foi comparável com a de S2C6 ($p < 0,13$). A sobrevivência de ratos tratados com S2C6 foi comparável à do controle isotípico ($p < 0,088$). Cada grupo de tratamento consistiu em 5 ratos, $N = 5$.

Figura 11 - São mostradas curvas de sobrevivência de ratos com tumores tratados com fármaco. As curvas de sobrevivência apresentadas são baseadas em dados agrupados. O grupo de ratos tratados com G12 e do controle isotípico consistiu em 20 animais em cada grupo. Os ratos tratados com S2C6 consistiram em 12 animais. A curva de sobrevivência do grupo tratado com G12 e o grupo tratado com S2C6 foi comparado como o grupo tratado com o controle isotípico, pelo teste de Log-rank utilizando o método de Bonferroni para ajustar para comparações múltiplas. A curva de sobrevivência do G12 é significativamente diferente comparada com o controle isotípico (p não-ajustado 0,004)

Figura 12 - São apresentados os níveis de citocina em ratos tratados. Foram tiradas amostras de soro 4 h após o segundo tratamento no dia 10 de ratos tratados e os níveis de citocina foram analisados. Os níveis de citocina de ratos tratado com G12, S2C6 e controle isotípico foram comparados utilizando uma ANOVA one-way com teste de Bonferroni de comparações múltiplas para calcular os valores de p ajustados. O tratamento com G12 é significativo comparado como os ratos tratados com S2C6. Os níveis de citocina marcados como *** apresentaram um $p < 0,001$, dados marcados como ** apresentaram um valor p de $0,001 < p < 0,01$, e níveis de citocina marcados com * apresentaram um valor p de $0,01 < p < 0,05$. O grupo de tratamento com G12 e o grupo de

tratamento com S2C6 consistiu em 23 ratos, $N = 23$. O grupo de tratamento do controlo isotípico consistiu em 18 ratos, $N = 18$.

Figura 13 - Níveis de anticorpo no soro de ratos tratados. Amostras de soro tiradas 4 h após o primeiro (dia 7) e segundo (dia 10) tratamento com G12 ou controlos, foram analisadas para níveis de anticorpos. No dia 7 e 10, o título de anticorpos estava significativamente mais baixo, aproximadamente duas vezes, para o clone G12 do anticorpo anti-CD40 comparado como o clone S2C6. Um teste t não-emparelhado de uma cauda, foi utilizado para calcular o valor p para a comparação das médias do G12 e S2C6. O título de soro G12 foi aproximadamente 100 vezes mais baixo comparado como o controlo isotípico devido a efeitos relacionados com o alvo (o título de G12 é semelhante ao título do isótipo em ratos negativos a CD40 humano).

Após o tratamento com doses idênticas (30 μ g) de G12 e S2C6 há uma diferença significativa nos títulos de soro de G12 e S2C6, 4 horas pós-tratamento. Isto indica que o G12 é retido mais tempo no tumor e tecido circundante, comparado com o S2C6. A diferença pode ser um resultado de uma taxa de associação alta do G12 e afinidade ao alvo (CD40), comparado como outros anticorpos de CD40, por exemplo S2C6.

Os níveis de anticorpo marcados com *** apresentaram um $p < 0,001$, dados marcados com ** apresentaram um valor p de $0,001 < p < 0,01$. O grupo de tratamento com G12 e o grupo de tratamento com S2C6 consistiu em 23 ratos, $N = 23$. O grupo de tratamento do controlo isotípico consistiu em 18 ratos, $N = 18$.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Evolução dirigida de um anticorpo agonista a CD40 com potência melhorada

Introdução

O anticorpo B44 é originado a partir da biblioteca n-CoDeR®, que é uma biblioteca de exibição de fragmentos de anticorpos humanos (Söderlind et al., 2000). Foram utilizadas

as sequências de aminoácido e um modelo de estrutura do anticorpo agonístico anti-CD40 B44, para desenhar as bibliotecas, exceto uma biblioteca, em que foram inseridas mutações aleatórias por toda a sequência.

Foram preparados anticorpos da invenção e selecionados como se segue.

Desenho das Bibliotecas

Foram construídas três bibliotecas desenhadas e uma biblioteca aleatória baseadas em análise de sequências e modelação estrutural do anticorpo B44. O modelo estrutural do B44 foi baseado em estruturas modelo adequadas, 1NL0 para VH e 2J6E para VL, no banco de dados de proteínas (PDB).

Na Al-10013-04, os resíduos dos pontos quentes ("hot spots") da linha germinal (ver LeFranc et al., IMGT/VQUEST, http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/IGandBcells/_UK/SomaticHypermutations/) do B44, foram identificados por análise de sequência de nucleótidos (Ho e Pastan "Therapeutic antibodies: Methods and protocols", 2009, (525) Humana Press). Mutações dos pontos quentes da linha germinal são posições de aminoácidos em domínios variáveis de imunoglobulina rearranjados, que são propensos a sofrer mutações durante o processo de hipermutação somática. Os resíduos dos pontos quentes da linha germinal no CDRL3 foram aleatorizados em conjunto com os resíduos dos pontos quentes da linha germinal no estruturalmente adjacente CDRL1. A variabilidade em cada uma das mutações dos pontos quentes da linha germinal foi restringida a 8-9 resíduos selecionados, para reduzir a complexidade e gerar uma biblioteca altamente funcional. Estes resíduos foram selecionados para representar as propriedades físico-químicas de todos (20) os aminoácidos que ocorrem naturalmente (Tanping, Protein Engineering, 2003, 16, 323-330) (Koide et al., 2009, ACS Chemical biology), mantendo ao mesmo tempo a complexidade e variabilidade teórica a um nível conveniente. A variabilidade teórica desta biblioteca foi de $1,9 \times 10^7$ variantes individuais.

Na AL-10013-05, todos os resíduos CDR expostos à superfície foram identificados baseados no modelo estrutural do B44. Estes resíduos foram feitos variar, restringindo a variabilidade até 1 ou dois resíduos homólogos, exceto em H3 onde foi introduzida variabilidade adicional (ver Figura 1). O objetivo foi o de criar uma biblioteca altamente funcional, mantendo ao mesmo tempo a complexidade e variabilidade teórica a um nível conveniente. A variabilidade teórica desta biblioteca foi de $1,9 \times 10^7$ variantes individuais.

Na biblioteca desenhada AL-10013-06, foram aleatorizados (n = 11) resíduos na parte central do CDRL3 e resíduos no estruturalmente adjacente CDRH2. Os resíduos foram identificados baseados no modelo estrutural do B44. A variabilidade em cada posição foi restringida até 4-5 resíduos, selecionados para representar propriedades físicoquímicas adequadas para a geração de um epítoto de ligação proteica com uma alta afinidade, "minimalista" (Koide et al., 2009, ACS Chemical biology, Fellouse et al., 2007, J Mol Biol)^{1,2}, retendo ao mesmo tempo a complexidade e variabilidade teórica a um nível conveniente. A biblioteca AL-10013-06 contém $1,6 \times 10^6$ variantes únicas.

Na biblioteca randomizada AL-10013-07, toda a sequência B44 foi randomizada por utilização de um método de PCR propenso-a-erros desenhado para minimizar parcialidades mutacionais (Genemorph). O tamanho gerado da biblioteca gerado foi de $6,3 \times 10^8$ variantes únicas.

Estratégia de seleção

As bibliotecas iniciais foram enriquecidas para ligantes ao CD40-Fcy, deste modo criando um agrupamento de sequências para cada biblioteca que codificava ligantes funcionais ("Ronda 1" no Quadro 1). O enriquecimento inicial para ligantes foi verificado por sequenciação.

Os agrupamentos de variantes funcionais de sequências foram subsequentemente recombinados por utilização do FIND®. A tecnologia do FIND® da Alligator Bioscience AB é descrita no

documento WO 02/48351 e WO 03/097834.

A biblioteca FIND®-recombinada compreendia 2×10^8 variantes únicas.

A biblioteca FIND®-recombinada produzida foi sujeita a quatro rondas de seleção adicional ("Rondas 2 até 5" no Quadro 1).

A partir de cada ronda de seleção, foram selecionados 2000 clones e rastreados numa análise de alto rendimento. O protocolo de seleção para maturação de afinidade incluiu etapas com impacto nas seguintes propriedades: afinidade; taxa de associação; taxa de dissociação, multimerização; e manutenção epitópica.

- De forma a aumentar a afinidade, foi incluída uma redução de dez vezes a concentração de antígeno em três rondas, seguido de uma redução de cinco vezes a concentração de antígeno em duas rondas.
- A taxa de associação foi desenhada para ser mantida, e foi endereçada pela redução do tempo de incubação.
- A taxa de dissociação foi desenhada para ser melhorada por aumento do rigor de lavagem. O CD40 não biotinilado foi incluído nas rondas 4 e 5 para prevenir a multimerização e para suprimir seleção para avidéz.

Os resultados da seleção para o rastreio de alto rendimento (HTS) são resumidos nos "mapas de calor" das bibliotecas, que mostram a posição e frequência das mutações geradas em cada biblioteca (Figura 1A).

A Figura 1B demonstra como é que a tecnologia de recombinação FIND® diminui o número de resíduos mutados aumentando ainda assim a afinidade.

Quadro 1: Estratégia de seleção

Ronda	Conc Ag (nM)	Incubação (min)^a	Lavagem (min)^b
1	10	60/30	Padrão
2	1	20/30	Padrão
3	0,1	10/20	Padrão + 10

4	0,02	5/10/20	Padrão + 30
5	0,004	5/10/15	Padrão + 120
^a O tempo de incubação é mostrado para: tempo de incubação como CD40 biotinilado / tempo de incubação adicional com CD40 não biotinilado na ronda 4 e 5 / tempo de incubação permitido para recuperar os complexos fago / antígeno em contas (beads) magnéticas. ^b A lavagem padrão compreendeu sete lavagens utilizando o tampão de seleção (PBS-T/BSA), seguido de quatro lavagens com PBS. O protocolo foi extendido na ronda 3-5 por adição de uma incubação prolongada (tempo dado em minutos).			

Rastreio de alto rendimento (RAR)

A partir de cada ronda de seleção, foram selecionados aproximadamente 2000 clones e rastreados numa análise de alto rendimento.

A análise de rastreio de alto rendimento foi desenhada como se segue: foi realizado um método para medir a taxa de dissociação em duas condições diferentes de lavagem num ELISA de ligação direta. Melhores taxas de dissociação correlacionaram-se com uma maior razão entre as duas medições. Os resultados da análise de rastreio de alto rendimento foram traçados, medindo a razão versus sinal de ligação no ELISA (Figura 2).

A análise RAR foi baseada num ELISA sanduíche que mede a ligação do fragmento ScFv-his, em sobrenadantes crus de *E. coli*, ao CD40 revestido em placas microtituladas.

Uma placa-394 branca com fundo plano de alta capacidade de ligação (Greiner #781074) foi revestida com CD40mFc (Apollo #9025H) por incubação durante 2 h à temperatura ambiente, ou de um dia para o outro a 4 °C. As placas foram lavadas [Tampão de lavagem: PBS + 0,05 % Tween 20 (PBST), lavador de microplacas Medicago#09-9410-100, ELx405 (BioTek)] e então bloqueadas em PBST + 3 % de leite em pó (Semper). As placas foram lavadas outra vez e as amostras ou controlos foram adicionados aos poços. As

amostras foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente e então lavadas, utilizando-se uma lavagem normal (3 ciclos de lavagem) ou lavagem intensa (3 ciclos de lavagem seguidos de incubação com PBST durante 30 min, seguidos de 3 ciclos de lavagem).

Foi adicionado Ac de detecção, Penta-His-HRP (Qiagen #1014992) e as placas foram subsequentemente reveladas com a utilização do sistema SuperSignal Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo #37069) e detetadas com o leitor Envision (Perkin Elmer).

Exemplo 2 - Afinidade melhorada de anticorpos anti-CD40 exemplificativos

Os anticorpos anti-CD40 recombinados por FIND® foram selecionados por terem afinidade melhorada (KD) ao recetor CD40. A afinidade dos anticorpos anti-CD40 ao alvo foi determinada por ressonância plasmónica de superfície e as constantes cinéticas são mostradas no Quadro 1 e Quadro 2. As afinidades foram melhoradas aproximadamente 100 vezes para os clones do anticorpo anti-CD40, comparados como o anticorpo original B44. Quadro 2 e Figura 3, a um pH fisiológico e 37 °C.

A afinidade melhorada dos clones do anticorpo anti-CD40 também foi observada a um pH baixo, Quadro 2. Foi utilizada ressonância plasmónica de superfície para determinar as constantes cinéticas a um pH de 5,4 e 37 °C, e comparadas ao anticorpo B44.

Os resultados mostraram que as afinidades gerais foram apenas moderadamente afetadas pela diminuição do pH para 5,4, e que o aumento de afinidade comparado com o B44 permanece (apesar das taxas de dissociação e de associação terem mudado individualmente). Isto poderá ter um benefício clínico em imunoterapia local que utilize a invenção.

Materiais e Métodos

Determinação de parâmetros cinéticos e constantes de afinidade tal como identificadas por ressonância de plasma de superfície

As medidas de afinidade dos anticorpos purificados por

ressonância plasmônica de superfície, utilizando o instrumento Biacore 3000, foram realizadas de acordo como os protocolos do fabricante.

O CD40hfc (R&Dsystems, EUA) foi imobilizado no chip sensor BIAcore, CM5, utilizando-se um acoplamento convencional de aminas. Os anticorpos anti-CD40 da invenção (diluídos em série de 1/3, de 1 até 0,012 nM) foram analisados para ligação em HBS-P (GE, BR-1003-68) a uma taxa de fluxo de 30 µl/min, a 37 °C e pH de 7,3. A associação foi seguida durante 3 minutos e a dissociação durante 10 minutos. A regeneração foi realizada duas vezes utilizando-se 50 mM de NaOH durante 30 segundos. Os parâmetros cinéticos e as constantes de afinidade foram calculadas com o software BIAevaluation 4.1.

Alternativamente, as amostras foram incubadas em tampão acetato com pH de 5,4, 10 mM de acetato, 150 mM de NaCl, 0,005 % de T20, a 37 °C.

Os resultados são mostrados nos Quadros 2 e 3.

Resultados

Quadro 2. Constantes cinéticas para a interação entre o recetor CD40 imobilizado e clones do anticorpo anti-CD40 comparado com B44 a um pH fisiológico tal como determinado por ressonância plasmônica de superfície.

Anticorpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
B44	$2,7 \times 10^6$	$4,5 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-9}$
A4	$7,3 \times 10^6$	$7,6 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-11}$
A5	$8,5 \times 10^6$	$9,6 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-11}$
F6	11×10^6	$3,2 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-11}$
F9	$2,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-5}$	$4,3 \times 10^{-11}$
G12	$9,6 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-11}$
H12	11×10^6	$4,9 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-11}$
B9	$8,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-11}$
C4	$7,5 \times 10^6$	$5,4 \times 10^{-5}$	$7,2 \times 10^{-11}$
H11	$8,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-11}$

Quadro 3. Constantes cinéticas para a interação entre o recetor CD40 imobilizado e clones do anticorpo anti-CD40 comparado com B44 a um pH = 5,4 tal como determinado por ressonância plasmónica de superfície.

Anticorpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
B44	$6,0 \times 10^6$	$5,5 \times 10^{-3}$	$9,3 \times 10^{-10}$
A4	$1,1 \times 10^7$	$2,2 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-11}$
A5	$1,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-11}$
G12	$9,6 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-11}$
H12	11×10^6	$4,9 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-11}$
B9	$9,7 \times 10^6$	$3,2 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-11}$
k_a , constante de taxa de associação; k_d , constante de taxa de dissociação; KD , constante de afinidade			

Exemplo 3 – Mapeamento de epítomos e reatividade cruzada dos anticorpos exemplificativos da invenção

O recetor CD40 consiste em quatro domínios extracelulares, cada um composto por dois tipos de unidades modulares (Naismith e Sprang, 1998, Trends Biochem, (23) 74-79) e cada módulo é estabilizado por uma ou duas ligações dissulfeto. De forma a analisar a especificidade fina do scFv selecionado, a localização de cada epítopo scFv foi determinada por mapeamento de domínios. A capacidade dos fragmentos scFv de se ligarem a construtos-CD40 truncados, expressos na superfície de células COS-7 ou L, foi medida com a utilização da análise FACScan (tal como descrito por Ellmark et al., 2002, Immunology). Os anticorpos exemplificativos da invenção foram capazes de ligar construtos onde o primeiro módulo tinha sido removido (D1/B2), mas não a construtos onde tinha sido removido o primeiro domínio completo do CD40 (ver Figura 4 e Quadro 4).

Quadro 4

	G12	A4	A5	C4	B44	H11
D1	+	+	+	+	+	+
D1/B2	+	+	+	+	+	+

D2	-	-	-	-	-	-
D2/B1	-	-	-	-	-	-
D3	-	-	-	-	-	-

Especificidade cruzada

Os clones do anticorpo da invenção reagem cruzadamente com o CD40 de um macaco cínomoigo, um macaco rhesus e outras espécies de macaco relevantes. Não reagem cruzadamente com CD4 murino ou canino.

Exemplo 4 - Suprarregulação de moléculas de superfície de células dendríticas por anticorpos anti-CD40 exemplificativos

A ligação do recetor CD40 induz ativação de células dendríticas, que potencialmente leva à ativação de uma resposta de células T antitumorais específica. As células dendríticas derivadas de monócitos, tratadas com um anticorpo anti-CD40, apresentam expressão suprarregulada das moléculas de superfície CD80, CD83, CD86 e HLA-DR. A suprarregulação das moléculas de superfície, CD80 e CD86, é necessária na coestimulação da ativação de células T.

Outros anticorpos de CD40 agonistas, por exemplo o CP-870893, têm uma potência aproximadamente 20 vezes mais alta para a ativação de células B do que para a ativação de células dendríticas (Gladue et al., 2011, Cancer Immunol, Immunother 60[7]; 1009-1017).

A ativação de células dendríticas é mais relevante clinicamente do que a ativação de células B, e o efeito nas células B pode resultar numa toxicidade que limita a dose a uma dose de tratamento que não ativa células dendríticas. É assim vantajoso melhorar a potência para ativação de células dendríticas, enquanto se mantém no mesmo intervalo a potência para ativação de células B. Os clones descritos na invenção têm uma potência para ativação de células B que está no mesmo intervalo que a ativação de células dendríticas, o que pode fornecer vantagens clínicas.

A potência melhorada dos clones de anticorpo anti-CD40

para promover ativação de células dendríticas em comparação com o anticorpo anti-CD40 original, B44, foi determinado por análises *in vitro*. Foi observada uma potência melhorada em clones de anticorpo anti-CD40 na ativação de células dendríticas, tal como determinado pela suprarregulação das moléculas de superfície CD86.

O Quadro 5 resume os resultados destes estudos de expressão de marcadores de superfície.

Na Figura 5A e B, é mostrada a expressão do CD86 e a sua dependência da concentração.

Materiais e Métodos

Análise de ativação de células dendríticas

As células dendríticas foram derivadas a partir de monócitos de sangue periférico. Sucintamente, células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram separadas a partir de camadas leuco-plaquetárias totais de sangue total pelo gradiente de Ficoll, e monócitos CD14+ foram isolados com microesferas de CD14+ MACS (Miltenyi) de acordo com as instruções do fabricante. As células CD14+, que atingiram ~95 % de pureza foram cultivadas num meio RPMI + 10 % de FCS, 150 ng/ml de GM-CSF e 50 ng/ml de IL-4 a 37 °C, durante seis dias, a uma concentração de 1×10^6 células/ml. Foi substituído 80% do meio, com meio fresco e citocinas, após três dias de cultura.

Após seis dias em cultura, as células tinham o CD14 subrregulado e o CD1a suprarregulado. Foram lavadas, ressuspensas em meio com citocinas frescas e séries de diluição de anticorpos estimuladores. As células foram cultivadas a uma concentração de 667000 células/ml e os anticorpos de 3,3 até 0,013 µg/ml. Os anticorpos estimuladores foram o B44 e oito clones, A4, A5, B9, C4, F6, G12, H11 e H12. As células dendríticas foram cultivadas a 37 °C durante 40 horas adicionais. Em seguida, a suprarregulação dos marcadores de ativação CD86, CD80 e HLA-DR, foram analisados por FACS.

Quadro 5. O EC50 médio e o múltiplo de aumento (fold increase) máximo de expressão de CD86, CD80, e MHC II de clones da invenção e B44.

	EC50 do ANTICORPO ANTI-CD40 G12 (µg/ml) (média ± dev.p.)	Múltiplo de aumento máximo do ANTICORPO ANTI-CD40 G12 (média ± dev.p.)
CD86	0,09 ± 0,056	136 ± 72,6
CD80	0,09 ± 0,056	292 ± 205
MHC II	0,14 ± 0,078	864 ± 450
	EC50 do ANTICORPO ANTI-CD40 A4 (µg/ml) (média ± dev.p.)	Múltiplo de aumento máximo do ANTICORPO ANTI-CD40 A4 (média ± dev.p.)
CD86	0,13 ± 0,08	149 ± 79,5
CD80	0,17 ± 0,047	599 ± 87,8
MHC II	0,14 ± 0,08	851 ± 485
	EC50 do ANTICORPO ANTI-CD40 C4 (µg/ml) (média ± dev.p.)	Múltiplo de aumento máximo do ANTICORPO ANTI-CD40 C4 (média ± dev.p.)
CD86	0,11 ± 0,050	164 ± 101
CD80	0,031 ± 0,0007	609 ± 136
MHC II	0,04 ± 0,014	395 ± 252
	EC50 do ANTICORPO ANTI-CD40 H11 (µg/ml) (média ± dev.p.)	Múltiplo de aumento máximo do ANTICORPO ANTI-CD40 H11 (média ± dev.p.)
CD86	0,14 ± 0,056	195 ± 88
CD80	0,14 ± 0,056	641 ± 37
MHC II	0,22 ± 0,15	481 ± 122
	EC50 do ANTICORPO ANTI-CD40 B44 (µg/ml) (média ± dev.p.)	Múltiplo de aumento máximo do ANTICORPO ANTI-CD40 B44 (média ± dev.p.)
CD86	0,37 ± 0,21	132 ± 81
CD80	0,25 ± 0,14	584 ± 73
MHC II	0,51 ± 0,20	811 ± 684

Exemplo 5 - Secreção melhorada de IFN- γ por células T induzidas por anticorpos anti-CD40 exemplificativos

A ativação *in vitro* de células T por células dendríticas estimuladas por clones de anticorpos anti-CD40 foi estudada e a produção de IFN- γ foi analisada.

Os resultados estão resumidos no Quadro 6.

A potência dos clones de anticorpos anti-CD40 foi melhorada comparado com o anticorpo B44 na célula T alogénica e na análise de células dendríticas.

Materiais e Métodos

Análise de ativação de células T alogénicas por células dendríticas

As células dendríticas foram derivadas a partir de monócitos de sangue periférico tal como descrito na análise de ativação de células dendríticas.

Após seis dias, as células dendríticas foram lavadas, ressuspensas em meio com citocinas frescas e cultivadas na presença de células T de um dador diferente. As células T foram isoladas do PBMC com microesferas de DD3+ MACS (Miltenyi) de acordo com as instruções do fabricante.

As concentrações de células dendríticas e células T na análise de ativação de células T foram de 667000 células/ml em cada tipo de célula. Além disso, a cocultura continha 150 ng/ml de GM-CSF e 50 ng/ml de IL-4, e séries de diluições de anticorpos estimuladores desde 3,3 até 0,013 μ g/ml. Anticorpos estimuladores foram o B44 e oito clones, A4, A5, B9, C4, F6, G12, H11 e H12. A cocultura foi incubada a 37 °C durante 72 horas adicionais. Em seguida, os sobrenadantes foram analisados para conteúdo de IFN- γ por ELISA (Biolegends), de acordo com as instruções do fabricante.

Quadro 6. Melhoramento da secreção de IFN- γ por anticorpos anti-CD40 da invenção comparado com o anticorpo B44.

Anticorpo	Allo DC/ T IFN- γ	
	EC50 (μ g/ml)	Max (pg/ml)
B44	0,2	8,7

A4	0,04	8,9
A5	0,08	9,5
B9	0,03	8,5
C4	0,12	9
F6	0,15	9
G12	0,05	9,1
H11	0,03	9,5

Exemplo 6 - Comparação de ativação de células B por anticorpos anti-CD40 exemplificativos

A ligação de anticorpos anti-CD40 agonistas ao CD40 em células B resulta na ativação de células B e proliferação, agregação homeotípica e suprarregulação de marcadores de superfície, tais como o CD23, CD30, CD80, CD86, Fas, complexo principal de histocompatibilidade (MHC) II e citocinas solúveis, por exemplo IL-6, TNF- α e TNF- β (Schönbeck e Libby, 2001, Cell Mol Life 58(19, 4-43).

A medição da proliferação de células B induzidas por CD40, é normalmente utilizada para avaliar anticorpos agonistas ao CD40 (Pound et al., 1999, Int Immunol, (11), 11-20).

Material e Métodos

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram separadas a partir de camadas leuco-plaquetárias totais de sangue total pelo gradiente de Ficoll, e células B CD19+ foram isoladas com microesferas de CD19+ MACS (Miltenyi) de acordo com as instruções do fabricante. As células CD19+ ($5-7,5 \times 10^4$ /poço), que alcançaram ~95 % de pureza foram cultivadas em meio RPMI + 10 % de FCS + 10 ng/ml de IL4 e séries de diluição de anticorpos. Após 48-72 h, a atividade metabólica foi medida com o CellTiter-Glo (Promega). Os valores EC50 foram calculados utilizando o GraphPad Prism.

Resultados

Quadro 7. Ativação de células B

Anticorpo	EC50 (μ g/ml) $\pm$ EFM
B44	0,204 $\pm$ 0,025561

A5	0,29 ± 0,0155
B9	0,48 ± 0,0528
C4	0,288 ± 0,06225
F6	0,40 ± 0,04415
F9	0,21 ± 0,0815
H11	0,46 ± 0,0953
H12	0,18 ± 0,003
G12	0,098 ± 0,019657
A4	0,16 ± 0,02395

Os anticorpos anti-CD40 da invenção têm potência semelhante na ativação de células B (ou seja, da mesma ordem de magnitude) que na do B44 (ver Quadro 7).

Exemplo 7 - Capacidade de anticorpos anti-CD40 exemplificativos da invenção para ligação a células RAMOS

A capacidade dos anticorpos anti-CD40 da invenção para se ligarem a células RAMOS foi determinada *in vivo*. Foi realizada análise de FACS dos anticorpos anti-CD40 ligados à linha celular RAMOS do linfoma de Burkitt humano. Os valores EC50 foram calculados para os anticorpos anti-CD40 da invenção e o anticorpo anti-CD40 B44 original.

Materiais e Métodos

A linha celular RAMOS do linfoma de Burkitt humano foi utilizada para análise de ligação (ECACC, Sigma Aldrich, EUA). Os anticorpos anti-CD40 não-conjugados da invenção foram analisados para ligação às células RAMOS.

As células RAMOS, aproximadamente 125000 células, foram incubadas com anticorpo anti-CD40, diluídas em série de 1/3, desde 30 até 0,0015 µg/ml, durante 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas duas vezes com tampão FACS e o anticorpo secundário, anti-humano Ig F(ab')₂/FITC de coelho (DAKO, Glostrup, Dinamarca), foi subsequentemente adicionado às células durante mais 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas e analisadas num aparelho FACScalibur, de acordo com as instruções do fabricante (Becton Dickinson, EUA) e foi então

determinada a intensidade média de fluorescência ("IMF").

Resultados

Os resultados são mostrados no Quadro 8.

Os clones do anticorpo anti-CD40 exemplificativo têm aproximadamente uma potência 100 vezes aumentada, comparada com o anticorpo B44.

Quadro 8. Ligação de clones de anticorpo a células RAMOS.

Anticorpo anti-CD40	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)
A4	$7,0 \times 10^{-3}$
A5	$6,2 \times 10^{-3}$
B9	$4,9 \times 10^{-3}$
C4	$6,1 \times 10^{-3}$
F6	$5,8 \times 10^{-3}$
G12	$6,7 \times 10^{-3}$
H11	$4,4 \times 10^{-3}$
H12	$8,9 \times 10^{-3}$
B44	0,38

Exemplo 8 - Efeitos dos anticorpos exemplificativos in vivo num modelo tumoral em rato

A atividade antitumor dos anticorpos anti-CD40 exemplificativos da invenção, foi estudada num modelo em rato NSG na ausência e na presença de células T e células dendríticas. (A) Estudo que utiliza tumores positivos ao CD40 na ausência de células T e células dendríticas

Materiais & Métodos

Obtivemos ratos fêmea NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rgtm/Wjl/SzJ (NSG)) da Jackson, e deixámo-los aclimatizar antes do tratamento. Foram injetadas subcutaneamente células de cancro da bexiga (células-EJ, 3×10^5 células/rato). Foi injetado intratumoralmente G12 ou um controlo isotópico no dia 0, 7 e 14 com uma dose de 1,2 mg/kg (30 μg). O volume do tumor foi medido no dia 0, 7, 10, 14, 17, 21, 23 e 27. Os tumores foram excisados e pesados no dia 28.

Resultados

Os resultados são mostrados nas Figuras 6 e 7.

(B) Estudo que utiliza tumores positivos ao CD40 na presença de células T e células dendríticas

Materiais & Métodos

Obtivemos ratos fêmea NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2^{tgtm}/Wjl/SzJ (NSG)) da Jackson, e deixámo-los aclimatizar antes do tratamento. Foram injetadas subcutaneamente células de cancro da bexiga (células-EJ, $2,5 \times 10^6$ células/rato) em conjunto com células DC (1×10^5) e células T (5×10^5) obtidas do mesmo dador. As células dendríticas foram preparadas a partir de monócitos (tal como descrito acima). Cada grupo de tratamento consistiu de 10 ratos ($n = 10$), onde células T e DC de dois dadores foi utilizado em cinco ratos/dador (ver Quadro 9).

Quadro 9

Substância de teste	Células moDC/T humanas (dador)	Número de ratos
PBS	Dador 1	5
	Dador 2	5
G12	Dador 1	5
	Dador 2	5

O G12 ou controlo de PBS, foi injetado intratumoralmente no dia 0, 7 e 14 com uma dose de 1,2 mg/kg (30 ug). O volume do tumor foi medido no dia 0, 7, 10, 14, 17, 21, 23 e 27. Os tumores foram excisados e pesados no dia 28.

Resultados

Os resultados são mostrados nas Figuras 8 e 9.

Exemplo 9 - Capacidade de resgatar células da apoptose

A capacidade dos anticorpos anti-CD40 para resgatar células, que expressam o CD40 humano, da apoptose e paragem de crescimento, foi realizada *in vitro*. A apoptose e paragem de crescimento foi induzida em células transfetadas WEHI-231 por adição de anticorpos anti-IgM. As células foram resgatadas por adição de anticorpo anti-CD40. Subsequentemente, foi

determinada a capacidade das células para proliferar.

Foi observada uma potência melhorada, até 40 vezes, para os clones de anticorpos anti-CD40 relativamente ao anticorpo B44 – ver Quadro 9.

Materiais e Métodos

Resgate da apoptose:

Foi transfetada uma linha celular estável com CD40 humano, huCD40/WEHI-231, e utilizada para investigar o resgate da apoptose e paragem de crescimento (Ellmark et al., 2003, Immunology, 108, 452-7). As células, huCD40/WEHI-231, foram cultivadas numa placa de 96 poços (2×10^4 células/poço) na presença ou ausência de IgM anti-rato (Jackson ImmunoResearch, EUA), e um anticorpo anti-CD40 da invenção, diluído em série de 1/3 desde 25 até 0,0001 µg/ml, durante 72 horas. Foi adicionado CellTiter-Glo e a mistura foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente (Promega, EUA). As células foram analisadas para proliferação medindo a libertação de ATP. O sinal de luminescência foi medido no FluoSTAR OPTIMA e o sinal foi normalizado (BMG, Alemanha).

Quadro 10. Capacidade dos clones de anticorpo para resgatarem células da apoptose e paragem de crescimento.

Clone de anticorpo anti-CD40	Múltiplo de variação da potência versus anticorpo B44
G12	19
A4	46
A5	19
B9	38
C4	52

Exemplo 10: Sumário da informação de sequência

Para cada anticorpo descrito abaixo, são mostradas as posições 1-112 do aminoácido V_L e as posições 1-119 do aminoácido V_H , em conjunto com a sequência de nucleótidos correspondente. Os CDRs são sublinhados nas sequências de aminoácidos – na sequência de aminoácidos V_L , os CDRs são

encontrados nas posições 23-40 (CDR1), posições 52-58 (CDR2) e 90-101 (CDR3) dos aminoácidos; na sequência de aminoácidos V_H, os CDRs são encontrados nas posições 26-35 (CDR1), posições 42-67 (CDR2) e 97-108 (CDR3) dos aminoácidos.

Anticorpo B44

Sequência de aminoácidos de cadeia leve variável (V_L) -
SEQ ID NO:58

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVYWYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGLVFGGGTKLTVLG

Sequência de nucleótidos de cadeia leve variável (V_L) -
SEQ ID NO:59

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H) -
SEQ ID NO:60

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVROAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLR AEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGLTVT
VSS

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H) -
SEQ ID NO:61

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT

AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCGGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

Clone do anticorpo A4

Sequência de aminoácidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:19

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSTSNIAGAGYKVYWYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGLVFGGGTKLTVLG

Sequência de nucleótidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:40

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:31

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLRADTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGLVT
VSS

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:49

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

sequências de aminoácidos CDR

V_L CDRs: CDR1: CTGSTSNIAGAGYKVY [SEQ ID NO:4]

CDR2: GNINRPS [SEQ ID NO:10]

CDR3: CAAWDDSLSGLV [SEQ ID NO:12]

V_H CDRs: CDR1: GFTFSTYGMH [SEQ ID NO:28]

CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO:29]

CDR3: CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO:30]

Clone do anticorpo A5

Sequência de aminoácidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:20

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYHVYQQLPGTAPKLLIYGSINRPSG
VPDRFSGSKSGTSGSLAISGLRSEDEADYYCAAWDSSSSGLVFGGGTKLTVLG

Sequência de nucleótidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:41

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:32

EVQLLESGLVQPGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLRRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGLTVT
VSS

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:50

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCGGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

sequências de aminoácidos CDR

V_L CDRs: CDR1: CTGSSSNIGAGYHVY [SEQ ID NO:5]

CDR2: GNINRPS [SEQ ID NO:10]

CDR3: CAAWDSSSSGLV [SEQ ID NO:13]

V_H CDRs: CDR1: GFTFSTYGMH [SEQ ID NO:28]
 CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYLFYADSVRGR [SEQ ID NO:29]
 CDR3: CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO:30]

Clone do anticorpo C4

Sequência de aminoácidos de cadeia leve variável (V_L) -
SEQ ID NO:21

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSTSNIGAGYKVYWYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
 VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGLVFGGGTKLTVLG

Sequência de nucleótidos de cadeia leve variável (V_L) -
SEQ ID NO:48

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
 CCATCTCTTGCACTGGGAGCACCTCCAACATCGGGGCAGGTTACAAAGTATATTGG
 TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
 GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
 CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
 GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
 GGT

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H) -
SEQ ID NO:33

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
 FYADTVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLRRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGTQVTV
 VSS

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H) -
SEQ ID NO:51

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
 AGTTACATTTTCTACGCAGACACAGTGAGGGGGCCGATTCATCTCCAGAGACAA
 CTCCGAGAACGCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
 GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGGGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
 AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

sequências de aminoácidos CDR

V_L CDRs: CDR1: CTGSTSNIGAGYKVY [SEQ ID NO:4]

CDR2: GNINRPS [SEQ ID NO:10]
CDR3: CAAWDDSLGLV [SEQ ID NO:12]
V_H CDRs: CDR1: GFTFSTYGMH [SEQ ID NO:28]
CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO:29]
CDR3: CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO:30]

Clone do anticorpo G4

Sequência de aminoácidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:22

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYKVYWYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCAAWDESITGLVFGGGTKLTVLG

Sequência de nucleótidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:42

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:34

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLR AEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGLVT
VSS

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:52

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

sequências de aminoácidos CDR

V_L CDRs: CDR1: CTGSSSNIGAGYKVY [SEQ ID NO:6]
CDR2: GNINRPS [SEQ ID NO:10]
CDR3: CAAWDESITGLV [SEQ ID NO:14]
V_H CDRs: CDR1: GFTFSTYGMH [SEQ ID NO:28]
CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO:29]
CDR3: CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO:30]

Clone do anticorpo F6

Sequência de aminoácidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:23

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVYWYQQLPGTAPKLLIYRNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDGSLLGLVFGGGTKLTVLG

Sequência de nucleótidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:43

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATCGTAACATCAATCG

GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGGCAGCCTGCTGGGTCTGGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTG
GGT

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:35

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLR AEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGT
LVTS

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:53

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
 CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGTA
 GTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAC
 TCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG
 TGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCCAA
 GGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

sequências de aminoácidos CDR

V_L CDRs: CDR1: CTGSSSNIGAGYDVY [SEQ ID NO:7]
 CDR2: RNINRPS [SEQ ID NO:11]
 CDR3: CAAWDGSLGLV [SEQ ID NO:15]
 V_H CDRs: CDR1: GFTESTYGMH [SEQ ID NO:28]
 CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO:29]
 CDR3: CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO:30]

Clone do anticorpo F9

Sequência de aminoácidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:24

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYGVYVYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDGLTGLLFGGGTKLTVLG

Sequência de nucleótidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:46

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCCTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGGTGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCTTCCC
TGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGGCACCTGACCGGTCTGCTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:36

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLRRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGTLVT
VSS

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:54

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

sequências de aminoácidos CDR

V_L CDRs: CDR1: CTGSSSNIGAGYGVY [SEQ ID NO:8]

CDR2: GNINRPS [SEQ ID NO:10]

CDR3: CAAWDGTLTGLL [SEQ ID NO:16]

V_H CDRs: CDR1: GFTFSTYGMH [SEQ ID NO:28]

CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO:29]

CDR3: CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO:30]

Clone do anticorpo G12

Sequência de aminoácidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:25

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYNVYWYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDKSISGLVFGGGTKLTVLG

Sequência de nucleótidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:45

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCGGGTTACAATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATAAGAGCATTCTGGTCTGGTTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAG
GT

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:37

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLR AEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGT
LVTVSS

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:55

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCGGATTACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

sequências de aminoácidos CDR

V_L CDRs: CDR1: CTGSSSNIGAGYNVY [SEQ ID NO:9]

CDR2: GNINRPS [SEQ ID NO:10]

CDR3: CAAWDRSISGLV [SEQ ID NO:17]

V_H CDRs: CDR1: GFTFSTYGMH [SEQ ID NO:28]

CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO:29]

CDR3: CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO:30]

Clone do anticorpo H12

Sequência de aminoácidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:26

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGLVFGGGTKLTVLG

Sequência de nucleótidos de cadeia leve variável (V_L) -

SEQ ID NO:46

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
 CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
 TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
 GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
 CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
 GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCTTA
 GGTGAGTAGAACGTACGCTAGCAAGCTTGGATCCACGATCCTGAGCAAGGACCTCT
 GCCCTCCCTGTTTCAGACCCTTGCTTGCCTCAGCAGGTCATTACAACCACTTCACCTC
 TGACCGCAGGGGCAGGGGACTAGATAGAATGACCTACTGAGCCTCGTCTGTCTGT
 CTGTCTGTCTCTCTGTTTGTCTGTCTGTCTCTCTGTTTGTCTCTGTCTGTCTGACA
 GGCGCAGGCTGGGTCTCTAAGCCTTGTTCTGTTCTGGCCTCCTCAGTCTGGGTTCT
 TGTCGGAACAGCTTTGCCCTTGGGTTACCTGGGTTCCATCTCCTGGGGAATTGGGA
 ACAAGGGGTCTGAGGGAGGCACCTCCTGGGAGACTTTAGAAGGACCCAGTGCCT
 CGGGGCTGATGCTCGGGA

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:38

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
 FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLR AEDTAVYYCARILRGGS GMDLWGQGLVT
 VSS

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:56

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
 AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA
 CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
 GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
 AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCAGGTGAGTCGTACGCTAGCAAGCTTTCTGGG
 GCAGGCCAGGCCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGAGGCAG
 GTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCCAGACACTGGACGCTGA
 ACCTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGGCCCTCTGCGCCCTGGGGCCAGCTCTGTC
 CCACACCGCGGTACATGGCACCCACCTCTCTTGACGCTCCACCAAGGGGCCATC
 GGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG
 GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAG
 GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCACGACT
 CTA

seqüências de aminoácidos CDR

V_L CDRs: CDR1: CTGSSSNIGAGYNVY [SEQ ID NO:9]
 CDR2: GNINRPS [SEQ ID NO:10]
 CDR3: CAAWDDSLSLV [SEQ ID NO:12]
 V_H CDRs: CDR1: GFTFSTYGMH [SEQ ID NO:28]
 CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO:29]
 CDR3: CARILRGSGMDL [SEQ ID NO:30]

Clones dos anticorpos B9 e H11

Seqüência de aminoácidos de cadeia leve variável (V_L) -
SEQ ID NO:27

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYNVYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
 VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDGGLGLVFGGGTKLTVLG

Seqüência de nucleótidos de cadeia leve variável (V_L) -
SEQ ID NO:47

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
 CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
 TATCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
 GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
 CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
 GGATGGCGGCCTGCTGGGTCTGGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
 GGT

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:39

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLRRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGLTVT
VSS

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H) -

SEQ ID NO:57

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
 AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
 CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
 GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
 AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCAGGTGAGTCGTACGCTAGCAAGCTTTCTGGG
 GCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGG

sequências de aminoácidos CDR

V_L CDRs: CDR1: CTGSSSNIGAGYNVY [SEQ ID NO:9]

CDR2: GNINRPS [SEQ ID NO:10]

CDR3: CAAWDGGLLGLV [SEQ ID NO:18]

V_H CDRs: CDR1: GETFSTYGMH [SEQ ID NO:28]

CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO:29]

CDR3: CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO:30]

Regiões constantes de anticorpos exemplificativos da invenção

>sp|P01857|IGHG1_HUMAN Ig gama-1 região C cadeia pesada
 OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[SEQ ID NO:62]

>gi|186127|gb|AAA59107.1| imunoglobulina lambda região C2
cadeia leve [Homo sapiens]
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK
QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[SEQ ID NO:63]

*Mutações de estrutura exemplificativas em região variável da
cadeia pesada (V_H)*

As mutações estão indicadas abaixo em negrito e
sublinhadas.

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H)

[SEQ ID NO:64]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSEN**IL**YLQMNSLRRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGT

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H)

[SEQ ID NO:65]

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCGCGATTACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGG**AGCG**GTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável (V_H)

[SEQ ID NO:66]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDN**SKNT**YLQMNSLRRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGT

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada variável (V_H)

[SEQ ID NO:67]

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
 AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTACCATTCTCCAGAGACAA
 CTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
 GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
 AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

Quadro 11

Mudanças de aminoácidos do clone do anticorpo e posição na V _L em relação ao anticorpo B44					
Clone do anticorpo	Mudança de aminoácido	Mudança de aminoácido	Mudança de aminoácido	Mudança de aminoácido	Mudança de aminoácido
A4	S26T	D34K			
A5	D34R	N53S	A73G	D95S	L97S
G4	D34K	D95E	L97I	S98T	
F6	G52R	D95G	S98L		
F9	D34G	D95G	S96T	S98T	V101L
G12	D34N	D95K	L97I		
H12	D34N				
B9	D34N	D95G	S96G	S98L	
C4	S26T	D34K			
H11	D34N	D95G	S96G	S98L	

Quadro 12

Mudanças dos aminoácidos do clone do anticorpo e posição na V _H em relação ao anticorpo B44	
Clone do anticorpo	Mudança de aminoácido
A4	
A5	
G4	
F6	
F9	

G12	
H12	
B9	
C4	S63T
H11	

Exemplo 11: Formulações farmacêuticas exemplificativas

Apesar de ser possível para um anticorpo da invenção ser administrado sozinho, é preferível apresentá-lo como um medicamento ou formulação farmacêutica, em conjunto com um ou mais veículos aceitáveis. O(s) veículo(s) deve(m) ser "aceitável(eis)" no sentido de serem compatíveis com o agente da invenção e não prejudiciais para os destinatários respectivos. Normalmente, os veículos serão água ou solução salina que serão estéreis e livres de pirógenos.

Os exemplos seguintes ilustram medicamentos ou composições farmacêuticas de acordo com a invenção em que o ingrediente ativo é um anticorpo da invenção.

Exemplo A: Comprimido

Ingrediente ativo	1 mg
Lactose	200 mg
Amido	50 mg
Polivinilpirrolidona	5 mg
Estearato de magnésio	4 mg

Os comprimidos são preparados a partir dos ingredientes anteriores por granulação húmida seguida de compressão.

Exemplo B: Solução oftalmológica

Ingrediente ativo	1 mg
Cloreto de Sódio, qualidade analítica	0,9 g
Tiomersal	0,001 g
Água purificada a	100 ml
pH ajustado a	7,5

Exemplo C: Formulações de comprimidos

As seguintes formulações A e B são preparadas por granulação húmida dos ingredientes com uma solução de povidona, seguida da adição de estearato de magnésio e compressão.

Formulação A

	mg/ comprimido	mg/ comprimido
(a) Ingrediente ativo	1	1
(b) Lactose B.P.	210	26
(c) Povidona B.P.	15	9
(d) Glicolato de amido de sódio	20	12
(e) Estearato de magnésio	5	3
	251	51

Formulação B

	mg/ comprimido	mg/ comprimido
(a) Ingrediente ativo	1	1
(b) Lactose	150	-
(c) Avicel PH 101®	60	26
(d) Povidona B.P.	15	9
(e) Glicolato de amido de sódio	20	12
(f) Estearato de magnésio	5	3
	251	51

Formulação C

	mg/comprimido
Ingrediente ativo	1
Lactose	200
Amido	50
Povidona	5
Estearato de magnésio	4
	260

As seguintes formulações, D e E, são preparadas por compressão direta dos ingredientes misturados. A lactose utilizada na formulação E é do tipo de compressão direta.

Formulação D

	mg/cápsula
Ingrediente ativo	1
Amido pré-gelatinado NF15	150
	151

Formulação E

	mg/cápsula
Ingrediente ativo	1
Lactose	150
Avicel®	100
	251

Formulação F (Formulação de Liberação Controlada)

A formulação é preparada por granulação húmida dos ingredientes (abaixo) com uma solução de povidona, seguido da adição de estereato de magnésio e compressão.

	mg/comprimido
(a) Ingrediente ativo	1
(b) Hidroxipropilmetilcelulose (Methocel K4M Premium)®	112
(c) Lactose B.P.	53
(d) Povidona B.P.C	28
(e) Estearato de magnésio	7
	201

A liberação de fármaco ocorre durante um período de 6-8 horas e ficou completa após 12 horas.

Exemplo D: Formulações de Cápsulas

Formulação A

Uma formulação de cápsulas é preparada misturando os

ingredientes da Formulação D no Exemplo C acima e enchendo uma cápsula de duas partes de gelatina dura. A Formulação B (infra) é preparada de maneira semelhante.

Formulação B

	<u>mg/cápsula</u>
(a) Ingrediente ativo	1
(b) Lactose B.P.	143
(c) Glicolato de amido de sódio	25
(d) Estearato de magnésio	<u>2</u>
	171

Formulação C

	<u>mg/cápsula</u>
(a) Ingrediente ativo	1
(b) Macrogol 4000 BP	<u>350</u>
	351

As cápsulas são preparadas por fusão do Macrogol 4000 BP, dispersando o ingrediente ativo na fusão e enchendo uma cápsula de duas partes de gelatina dura com a fusão.

Formulação D

	<u>mg/cápsula</u>
Ingrediente ativo	1
Lecitina	100
Óleo de amendoim	<u>100</u>
	201

As cápsulas são preparadas dispersando o ingrediente ativo na lecitina e óleo de amendoim, e enchendo cápsulas de gelatina moles, elásticas, com a dispersão.

Formulação E (Cápsula de Libertação Controlada)

A seguinte formulação de cápsulas de libertação controlada é preparada por extrusão dos ingredientes a, b e c, utilizando uma extrusora, seguido de esferonização do extrudado e secagem. As pellets (pelotas) secas são então

revestidas com uma membrana controladora de libertação (d) e enchem uma cápsula de duas partes de gelatina dura.

	mg/cápsula
(a) Ingrediente ativo	1
(b) Celulose microcristalina	125
(c) Lactose B.P.	125
(d) Etilcelulose	13
	264

Exemplo E: Formulação Injetável

Ingrediente Ativo 1 mg

Tampão fosfato livre de pirógenos, estéril (pH 7,0) a 10 ml

O ingrediente ativo é dissolvido na maior parte do tampão fosfato (35-40 °C), completado em volume e filtrado através de um filtro microporoso estéril para dentro de um frasco de vidro ambarizado de 10 ml estéril (tipo 1) e selado com fechos estéreis e selantes.

Exemplo F: Injeção Intramuscular

Ingrediente ativo	1 mg
Álcool benzílico	0,10 g
Glucofurol 75®	1,45 g
Água para injeção q.s.p.	3,00 ml

O ingrediente ativo é dissolvido no glicofurol. O álcool benzílico é então adicionado e dissolvido, e é adicionada água a 3 ml. A mistura é então filtrada através de um filtro microporoso através de um filtro microporoso estéril e selado em frascos de vidro de 3 ml estéreis (tipo 1).

Exemplo G: Suspensão de Xarope

Ingrediente ativo	1 mg
Solução de sorbitol	1,5000 g
Glicerol	2,0000 g
Celulose dispersiva	0,0750 g
Benzoato de sódio	0,0050 g
Sabor, Pêssego 17.42.3169	0,0125 ml

Água purificada q.s.p

5,0000 ml

O benzoato de sódio é dissolvido numa porção de água purificada e a solução de sorbitol é adicionada. O ingrediente ativo é adicionado e dispersado. O espessante é dispersado no glicerol (celulose dispersiva). As duas dispersões são misturadas e completadas até ao volume requerido com a água purificada. É alcançado um espessamento maior como requerido, por cisalhamento extra da suspensão.

Exemplo H: Supositório

	mg/supositório
(a) Ingrediente ativo (63 µm) *	1
(b) Gordura dura, BP (Witepsol H15	1770
- Dynamit Nobel	
	1771

*O ingrediente ativo é utilizado como um pó em que pelo menos 90 % das partículas têm 63 µm de diâmetro ou menos.

Um quinto do Witepsol H15 é fundido numa panela de pressão a um máximo de 45 °C. O ingrediente ativo é peneirado através de uma peneira de 200 µm e adicionado à base fundida misturando, com uma Silverson equipada com uma cabeça cortante, até que seja conseguida uma dispersão uniforme. Mantendo a mistura a 45 °C, o Witepsol H15 restante é adicionado à suspensão e agitado para assegurar uma mistura homogénea. A suspensão inteira é passada através de uma tela de aço inoxidável de 250 µm e, com agitação contínua, é deixada arrefecer até 40 °C. A uma temperatura de 38 °C até 40 °C, enche-se 2,02 g da mistura em moldes plásticos adequados. Os supositórios são deixados arrefecer até à temperatura ambiente.

Exemplo 1: Pessários

	mg/pessário
Ingrediente ativo	1
Dextrose anidra	380
Amido de batata	363

Os ingredientes acima são misturados diretamente e são preparados pessários por compressão direta da mistura resultante.

Exemplo 12: Efeito de anticorpos exemplificativos in vivo num modelo tumoral em rato

A atividade antitumoral de um anticorpo anti-CD40 da invenção foi estudada em ratos transgênicos com CD40 humano, inoculados com células de cancro da bexiga. As células de cancro da bexiga MB49 foram inoculadas subcutaneamente em ratos transgênicos com CD40 humano. Os ratos foram tratados peritumoralmente no dia 7 e 10 com G12 ou controlos. O tratamento com G12 resulta num efeito antitumoral significativo comparado com o controlo isotípico.

O anticorpo de referência S2C6 é um anticorpo anti-CD40 quimérico composto pelos domínios variáveis murinos, VH e VL, fundidos às regiões constantes gamal e capa humanas respetivamente (Patente Europeia N°. EP1885399, Francisco et al., 2000 Cancer Research). O anticorpo é assim um análogo do anticorpo anti-CD40 humanizado SGN-40 (Law et al., 2005 Cancer Research). O SGN-40 foi estudado em testes clínicos (Advani et al., 2009 J Clinical Oncology; Hussein et al., 2010 Haematologica).

Material e Métodos

A linha celular MB49 é um carcinoma das células de transição induzidas por carcinogénicos, derivada a partir de ratos macho C57BL/6 (Summerhayes & Franks, 1979, Journal of the National Cancer Institute). O MB49 expressa CD40 murino mas não expressa CD40 humano. O G12 não reage cruzadamente como CD40 murino e não se pode ligar a células tumorais MB49.

Foram inoculadas subcutaneamente $2,5 \times 10^5$ células MB49 de cancro da bexiga no flanco de ratos transgênicos C57BU6 com CD40 feminino humano, no dia 0. Os ratos transgênicos com CD40

humano expressam CD40 *wild-type* (tipo selvagem) humano numa base ("background") de rato com deficiência em CD40 (mCD40^{-/-}). O tratamento começou no dia 7 com anticorpos injetados peritumoralmente no tumor subcutâneo no dia 7 e dia 10 (duas doses). O volume do tumor foi medido 2 vezes/semana com um compasso de calibre e calculado pela fórmula do volume de uma elipsoide. Os ratos foram sacrificados se o tumor excedeu 1cm³ ou se desenvolveram úlceras. Foram tiradas amostras de soro 4 h após cada tratamento. Os níveis de citocina nas amostras de soro foram analisados no Mouse ProInflammatory 7-Plex Ultra-Sensitive Kit, utilizando a plataforma Meso Scale Discovery (MSD, Gaithersburg, MD, EUA). O título do anticorpo foi medido no soro, utilizando ELISA sanduiche. A linha celular MB49 é um carcinoma das células de transição induzidas por carcinogénicos, derivada a partir de ratos macho C57BU6 (Summerhayes & Franks, 1979, Journal of the National Cancer Institute). O MB49 expressa CD40 murino mas não expressa CD40 humano. O G12 não reage cruzadamente com o CD40 murino e não se pode ligar a células tumorais MB49.

Resultados

Os resultados são mostrados na Figura 10.

O tratamento como G12 aumenta significativamente a sobrevivência de animais comparado com o controlo isotípico ($p < 0,013$). A curva de sobrevivência de ratos tratados com o G12 foi comparável com o S2C6 ($p < 0,13$). A sobrevivência de ratos tratados com o S2C6 foi comparável com o controlo isotípico ($p < 0,088$).

Exemplo 13: Efeito de anticorpos exemplificativos in vivo num modelo tumoral em rato

A atividade antitumoral dos anticorpos anti-CD40 Interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e citocina derivada de queratinócitos (CQ) (também conhecido por ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) / CXCL1) foram estudados utilizando-se dados agrupados ("pooled") de um grupo maior de animais tratados. O grupo de tratamento G12 continha

um grupo de 20 animais, o grupo de tratamento S2C6 continha 12 animais, e o grupo de controlo isotípico continha 20 animais.

As células de cancro da bexiga MB49 foram inoculadas subcutaneamente em ratos transgênicos com CD40 humano. Os ratos foram tratados peritumoralmente no dia 7 e 10 com G12, ou controlos. O tratamento com G12 fornece um aumento significativo de sobrevivência dos ratos com tumores comparado com o grupo tratado com o controlo isotípico (Figura 11).

Foram tiradas amostras de soro de ratos tratados e analisadas para níveis de citocina. Os níveis de citocina após tratamento demonstram uma indução mais forte da resposta imunitária do G12 comparado com o anticorpo de referência, S2C6 (Figura 12).

Materiais e Métodos

Foram inoculadas subcutaneamente $2,5 \times 10^5$ células MB49 de cancro da bexiga no flanco de ratos transgênicos C57BL/6 com CD40 feminino humano, no dia 0. Os ratos transgênicos com CD40 humano expressam CD40 *wild-type* humano numa base de rato com deficiência em CD40 (mCD40-/-). O tratamento começou no dia 7 com anticorpos injetados peritumoralmente no tumor subcutâneo no dia 7 e dia 10 (duas doses). O volume do tumor foi medido 2 vezes/semana com um compasso de calibre e calculado pela fórmula do volume de uma elipsoide. Os ratos foram sacrificados se o tumor excedeu 1cm^3 ou se desenvolveram úlceras. Foram retiradas amostras de soro 4 h após cada tratamento. Os níveis de citocina nas amostras de soro foram analisados no Mouse ProInflammatory 7-Plex Ultra-Sensitive Kit, utilizando a plataforma Meso Scale Discovery (MSD, Gaithersburg, MD, EUA). A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA).

Resultados

Os resultados são mostrados nas Figuras 11 e 12.

Exemplo 14: Análise in vivo de níveis de anticorpos

Os ratos tratados foram analisados para níveis de anticorpos no soro. As amostras de soro foram tiradas após o

primeiro (dia 7) e segundo (dia 10) tratamentos. O título de anticorpo foi significativamente mais baixo para o clone do anticorpo anti-CD40 comparado com os anticorpos de referência. Os dados são mostrados na Figura 13.

Materiais & Métodos

Foram analisadas para os níveis de anticorpos, amostras de soro tiradas 4 h após o primeiro (dia 7) e segundo (dia 10) tratamentos da experiência descrita no Exemplo I. O título do anticorpo foi medido no soro utilizando ELISA sanduiche.

O grupo de tratamento G12 consistiu em 23 ratos (N = 23), o grupo de tratamento do anticorpo de referência S2C6 consistiu em 23 ratos (N = 23) e o grupo de tratamento do controle isotípico consistiu em 18 ratos (N = 18).

Resultados

Os resultados são mostrados na Figura 13.

REFERÊNCIAS

- Advani et al., Phase I Study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody Dacetuzumab in refractory of recurrent non-hodgkin's lymphoma. *J Clinical Oncology* 27: 4371-4377 (2009)
- Armitage et al., Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357: 80-82 (1992).
- Bajorath, J. Detailed comparison of two molecular models of the human CD40 ligand with an x-ray structure and critical assessment of model-based mutagenesis and residue mapping studies. *J Biol Chem* 273, 24603-9 (1998).
- Bajorath, J. et al. Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis. *Bio-chemistry* 34, 9884-92 (1995).
- Bajorath, J. et al. Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand interaction. *Biochemistry* 34, 1833-44 (1995).
- Carter et al., *Nature Reviews Immunology* 6, 343-357 (2006).
- Diehl, L. et al. CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance

and augments anti-tumor vaccine efficacy. Nat. Med. 5, 774-779 (1999).

Ellmark et al., Identification of a Strongly Activating Human Anti-Cd40 Antibody that Suppresses HIV Type 1 Infection. AIDS Research and Human Retroviruses, 24, 3, 367-373, (2008).

Ellmark et al., Modulation of the CD40-CD40L ligand interaction using human anti-CD40 single-chain antibody fragments obtained from the n-CoDeR® phage display library. Immunology, 106, 456-463.

Patente Europea nº EP1885399

Fellouse, F.A. et al. High-throughput generation of synthetic antibodies from highly functional minimalist phage-displayed libraries. J Mol Biol 373, 924-940 (2007).

Francisco et al., Agonistic properties and *in vivo* antitumor activity of the anti-CD40 antibody SGN-14. Cancer Research 60, 3225-3231 (2000)

French, R.R., et al., CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. Nat Med 5, 548-53 (1999).

Gatenby et al., Why do cancers have high aerobic glycolysis? Nature review Cancer 4, 891-899 (2004).

Glaude et al., The CD40 agonist antibody CP-870,893 enhances dendritic cell and B-cell activity and promotes anti-tumor efficacy in SCID-hu mice. Cancer Immunol Immunotherapy 60(7): 1009-17 (2011).

Hussein et al., A phase I multi-dose study of dacetumumab (SGN-40, a humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with multiple myeloma. Haematologica, 95: 845-848 (2010)

Janeway's Immunobiology, 7ª edición, Garland Science (2008).

Kai et al., Nature Biotechnology, 26, 209-211 (2008).

Kalbasi, A. et al. CD40 expression by human melanocytic lesions and melanoma cell lines and direct CD40 targeting with the therapeutic anti-CD40 antibody CP-870,893. J Immunother 33, 810-816 (2010).

Katakura et al., Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (2008).

Koide, A., et al. Exploring the capacity of minimalist protein interfaces: interface energetics and affinity maturation to picomolar KD of a single-domain antibody with a flat paratope. J Mol Biol 373, 941-953 (2007).

Law et al., Preclinical antilymphoma activity of a humanized anti-CD40 monoclonal antibody, SGN-14 Cancer Research 65,18, 8331-8338 (2005)

Loskog, A.S. y Eliopoulos, A.G. The Janus faces of CD40 in cancer. Semin. Immunol 21, 301-307 (2009).

Quezada, S.A., Jarvinen, L.Z., Lind, E.F., y Noelle, R.J. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. Annu. Rev. Immunol. 22: 307-28., 307-328 (2004).

Schonbeck, U. y Libby, P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. Cell Mol Life Sci 58, 4-43 (2001).

Siepmann et al., Rewiring CD40 is necessary for delivery of rescue signals to B cells in germinal centres and subsequent entry into the memory pool. Immunology, 102(3), 263-72 (2001).

Sklar et al., Annual Review Biophysical Biomol Structure, 31, 97-119, (2002).

Söderlind, E. et al. Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. Nat Biotechnol 18, 852-6 (2000)

Sotomayor, E.M. et al. Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through *in vivo* ligation of CD40. Nature Medicine 5, 780-787 (1999).

Staveley-O'Carroll, K. et al. In vivo ligation of CD40 enhances priming against the endogenous tumor antigen and promotes CD8+ T cell effector function in SV40 T antigen transgenic mice. J Immunol 171, 697-707 (2003).

Summerhayes y Franks, Journal of the National Cancer Institute 62: 1017-1023 (1979)

Tasci, I. et al., Soluble CD40 ligand levels in otherwise

healthy subjects with impaired fasting glucose. *Cell. Life. Sci.* 58, 4-43 (2001).

Tong et al., CD40-directed gene therapy shows prospects for treating human cancers. *Cancer Gene Therapy* 10(1), 1-13 (2003)

Tutt et al., T cell immunity to lymphoma following treatment with anti-CD40 monoclonal antibody. *J Immunol* 168 (6) 2720-8, (2002).

van Kooten ,C. y Banchereau, J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67, 2-17 (2000).

van Mierlo,G.J. et al. CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5561-5566 (2002).

White et al., Interaction with Fc ϵ RIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody *Journal of Immunology* (187), 1754-1763, (2011).

Wilson et al., *Cancer Cell* (19), 101-113, (2011).

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 2006073443 A [0010]
- US 5643872 A [0051]
- US 6008058 A [0051]
- WO 9832845 A [0057]
- WO 9606641 A [0117]
- US 4348376 A, Goldenberg [0133]
- WO 9410323 A [0138]
- US 5180818 A [0141]
- US 5168053 A [0141]
- US 5149796 A [0141]
- US 5116742 A [0141]
- US 5093246 A [0141]
- US 4987071 A [0141]
- EP 0415731 A [0142]
- US 4440859 A, Rutter [0171]
- US 4530901 A, Weissman [0171]
- US 4582800 A, Crowl [0171]
- US 4677063 A, Mark [0171]
- US 4678751 A, Goeddel [0171]
- US 4704362 A, Itakura [0171]
- US 4710463 A, Murray [0171]
- US 4757006 A, Toole, Jr. [0171]
- US 4766075 A, Goeddel [0171]
- US 4810648 A, Stalker [0171]
- US 4235871 A [0205]

- US 5851451 A [0206]
- EP 0213303 A [0206]
- WO 0248351 A [0261] [0274]
- WO 03097834 A [0261] [0274]
- EP 1885399 A [0367] [0381]

Literatura de não patente citada na descrição

- STAGG et al. *Immunol Rev.*, 2007, vol. 220, 82-101 [0003]
- MELIEF. *Immunity*, 2008, vol. 29, 372-383 [0003]
- MELERO et al. *Nat Rev Cancer*, 2007, vol. 7, 95-106 [0003]
- WALDMANN. *Annu. Rev Med.*, 2006, vol. 57, 65-81 [0003]
- KHAWLI et al. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2008, vol. 181, 291-328 [0003]
- BERINSTEIN. *Vaccine*, 2007, vol. 25 (2), B72-B88 [0003]
- MELLOR ; MUNN. *Nat Rev Immunol.*, 2008, vol. 8, 74-80 [0003]
- SCHONBECK ; LIBBY. *Cell Mol Life Sci*, 2001, vol. 58 (1), 4-43 [0005]
- ARMITAGE et al. *Nature*, 1992, vol. 357, 80-82 [0006]
- SCHONBECK et al. *Cell Mol Life Sci.*, 2001, vol. 58, 40-43 [0006] [0026]
- VAN KOOTEN et al. *J. Leuk. Biol.*, 2000, vol. 67, 2-17 [0006]
- QUEZADA et al. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, vol. 22, 3077-328 [0006]
- VAN KOOTEN et al. *J. Leuk., Biol.*, 2000, vol. 67, 2-17 [0006] [0026]
- FOY et al. *J Exp Med*, 1993, vol. 5, 1567-1575 [0007]
- SIEPMANN et al. *Immunology*, 2001, vol. 3, 263-272 [0007]
- ALLEN et al. *Science*, 1993, vol. 259, 990-993 [0007]
- VAN KOOTEN et al. *J Leucoc Biol*, 2000, vol. 67, 2-17 [0007] [0014]
- SOTOMAYOR et al. *Nature Medicine*, 1999, vol. 5, 780-787 [0007] [0009] [0014]
- TONG et al. *Cancer Gene Therapy*, 2003, vol. 10 (1), 1-13 [0008]

- OTTALANO et al. *Tumori*, 2002, vol. 88 (5), 361-6 [0008]
- TUTT et al. *J Immunol.*, 2002, vol. 168 (6), 2720-8 [0008]
- VAN MIERLO et al. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2002, vol. 99 (8), 5561-6 [0008]
- KALBASHI et al. *J Immunotherapy*, 2010, vol. 33, 810-816 [0009]
- LOSKOG et al. *Semin Immunology*, 2009, vol. 21, 301-307 [0009]
- FRENCH et al. *Nature Medicine*, 1999, 548-553 [0009] [0014]
- STAVELEY et al. *Nature Medicine*, 2003, vol. 171, 697-707 [0009]
- KHALIL ; VONDERHEIDE. *Update on Cancer Therapeutics*, 2007, vol. 2, 61-65 [0009]
- HUSSEIN et al. *Haematologica*, 2010, vol. 95, 845-848 [0009]
- VAN MIERLO et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, 5561-5566 [0010]
- VAN MIERLO et al. *J Immunol*, 2004, vol. 173, 6753-6759 [0010]
- GLADUE et al. *Cancer Immunol Immunotherapy*, 2011, vol. 7, 1009-1017 [0014]
- VONDERHEIDE et al. *Journal of Clinical Oncology*, 2007, vol. 25 (7), 876-883 [0014]
- TASCI et al. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001, vol. 58, 4-43 [0019]
- JANEWAY'S. *Immunobiology*. Garland Science, 2008 [0020] [0381]
- CARTER. *Nature Reviews Immunology*, 2006, vol. 6, 343-357 [0020]
- MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0030]
- SAMBROOK ; RUSSELL. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0032]
- HUANG ; MILLER. *Adv. Appl. Math.*, 1991, vol. 12, 337-357 [0039]
- THOMPSON et al. *Nucl. Acid Res.*, 1994, vol. 22, 4673-4680 [0040]
- MEZIERE et al. *J. Immunol.*, 1997, vol. 159, 3230-3237 [0045]

- **VEBER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, 2636 [0048]
- **THURSELL et al.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1983, vol. 111, 166 [0048]
- **D. H. RICH.** *Protease Inhibitors.* Elsevier, 1986 [0053]
- **SODERLIND et al.** *Nature Biotechnol.*, 2000, vol. 18, 852-6 [0057]
- **ELLMARK et al.** *Immunology*, 2002, vol. 106, 456-463 [0057]
- **ELLMARK et al.** *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2008, vol. 243, 367-372 [0057]
- **KATAKURA et al.** *Journal of Molecular Catalysis*, 2004, vol. 28, 191-200 [0060]
- **SKLAR et al.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002, vol. 31, 97-119 [0061]
- **H ZOLA.** *Monoclonal Antibodies; A manual of techniques.* CRC Press, 1988 [0076]
- **SGR HURRELL.** *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application.* CRC Press, 1982 [0076]
- **VAUGHAN et al.** *Nature Biotechnol.*, 1998, vol. 16, 535-539 [0078]
- **NEUBERGER et al.** *8th International Biotechnology Symposium*, 1998, 792-799 [0080]
- **STROHL et al.** *Curr Opin Biotechnol*, 2009, vol. 20, 685-691 [0104]
- **LI et al.** *Science*, 2011, vol. 333, 1030-1034 [0104]
- **BAUMINGER; WILCHEK.** *Methods Enzymol.*, 1980, vol. 70, 151-159 [0112]
- **BURROWS ; THORPE.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 8996-9000 [0117]
- **RAN et al.** *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, 4646-4653 [0117]
- **HUANG et al.** *Science*, 1997, vol. 275, 547-550 [0117]
- **TSAI et al.** *Dis. Colon Rectum*, 1995, vol. 38, 1067-1074 [0117]
- **AIELLO et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 10457-10461 [0117]

- SENTER, P.D. et al. Anti-tumour effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 4842-4846 [0121]
- BAGSHAW. *Br. J. Cancer*, 1987, vol. 56, 531-2 [0121]
- BAGSHAW, K.D. et al. A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites. *Br. J. Cancer.*, 1988, vol. 58, 700-703 [0121]
- BAGSHAW. *Drug Dev. Res.*, 1995, vol. 34, 220-230 [0125]
- RODRIGUES, M.L. et al. *Chemistry & Biology*, 1995, vol. 2, 223 [0125]
- O'SULLIVAN et al. *Anal. Biochem.*, 1979, vol. 100, 100-108 [0129]
- MCGINN et al. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, vol. 88, 1193-11203 [0131]
- SHEWACH; LAWRENCE. *Invest. New Drugs*, 1996, vol. 14, 257-263 [0131]
- HORSMAN. *Acta Oncol.*, 1995, vol. 34, 571-587 [0131]
- SHENOY; SINGH. *Clin. Invest.*, 1992, vol. 10, 533-551 [0131]
- MITCHELL et al. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1989, vol. 56, 827-836 [0131]
- ILIAKIS ; KURTZMAN. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1989, vol. 16, 1235-1241 [0131]
- BROWN. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1989, vol. 16, 987-993 [0131]
- BROWN. *Cancer*, 1985, vol. 55, 2222-2228 [0131]
- LANG et al. *J. Neurosurg.*, 1998, vol. 89, 125-132 [0132]
- COCO MARTIN et al. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 1134-1140 [0132]
- PRIMUS et al. *Bioconj. Chem.*, 1996, vol. 7, 532-535 [0133]
- DOUGHERTY et al. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, vol. 90, 889-905 [0134]
- ZIEGLER et al. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1997, vol. 89, 1027-1036 [0136]
- LEE et al. *Anticancer Res.*, 1996, vol. 16, 1805-1811 [0136]

- KNUDSEN ; NIELSEN. *Anticancer Drugs*, 1997, vol. 8, 113-118 [0137]
- MICHAEL et al. *Gene Therapy*, 1995, vol. 2, 660-668 [0138]
- MILLER; VILE. *Faseb J.*, 1995, vol. 9, 190-199 [0138]
- MARTIN ; PAPAHA DJOPOULOS. *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0139]
- DURAI et al. *Anticancer Res.*, 1997, vol. 17, 3307-3312 [0141]
- CORNELIUS et al. *J. Immunol.*, 1998, vol. 161, 6845-6852 [0145]
- FRAKER et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1978, vol. 80, 49-57 [0150]
- J-F CHATAL. *Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*. CRC Press, 1989 [0150]
- COHEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1972, vol. 69, 2110 [0186]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0186]
- SHERMAN et al. *Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, 1986 [0186]
- BEGGS. *Nature*, 1978, vol. 275, 104-109 [0186]
- LUCHANSKY et al. *Mol. Microbiol.*, 1988, vol. 2, 637-646 [0188]
- BECKER ; GUARENTE. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 194, 182 [0189]
- SOUTHERN. *J. Mol. Biol.*, 1975, vol. 98, 503 [0190]
- BERENT et al. *Biotech.*, 1985, vol. 3, 208 [0190]
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*. Mack Publishing Company, 1990 [0199]
- *handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press, 2000 [0199]
- DEROSI et al. *Trends Cell Biol.*, 1998, vol. 8, 84-87 [0219]
- VAN MIERLO et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, vol. 99, 5561-5566 [0240]
- KALBASI et al. *J Immunotherapy*, 2010, vol. 33, 810-816 [0240]
- HO ; PASTAN. *Therapeutic antibodies: Methods and protocols*.

Humana Press, 2009, 525 [0269]

- TANPING. *Protein Engineering*, 2003, vol. 16, 323-330 [0269]
- KOIDE et al. *ACS Chemical biology*, 2009 [0269] [0271]
- FELLOUSE et al. *J Mol Biol*, 2007 [0271]
- NAISMITH ; SPRANG. *Trends Biochem*, 1998, vol. 23, 74-79 [0293]
- ELLMARK et al. *Immunology*, 2002 [0293]
- GLADUE et al. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, vol. 60 (7), 1009-1017 [0296]
- SCHONBECK ; LIBBY. *Cell Mol Life*, 2001, vol. 58 (1), 4-43 [0309]
- POUND et al. *Int Immunol*, 1999, vol. 11, 11-20 [0310]
- ELLMARK et al. *Immunology*, 2003, vol. 108, 452-7 [0327]
- FRANCISCO et al. *Cancer Research*, 2000 [0367]
- LAW et al. *Cancer Research*, 2005 [0367]
- ADVANI et al. *J Clinical Oncology*, 2009 [0367]
- HUSSEIN et al. *Haematologica*, 2010 [0367]
- SUMMERHAYES ; FRANKS. *Journal of the National Cancer Institute*, 1979 [0368] [0369]
- ADVANI et al. Phase I Study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody Dacetuzumab in refractory of recurrent non-hodgkin's lymphoma. *J Clinical Oncology*, 2009, vol. 27, 4371-4377 [0381]
- ARMITAGE et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*, 1992, vol. 357, 80-82 [0381]
- BAJORATH, J. Detailed comparison of two molecular models of the human CD40 ligand with an x-ray structure and critical assessment of model-based mutagenesis and residue mapping studies. *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, 24603-9 [0381]
- BAJORATH, J. et al. Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 1995, vol. 34, 9884-92 [0381]
- BAJORATH, J. et al. Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand

- interaction. *Biochemistry*, 1995, vol. 34, 1833-44 [0381]
- **CARTER et al.** *Nature Reviews Immunology*, 2006, vol. 6, 343-357 [0381]
 - **DIEHL, L. et al.** CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat. Med.*, 1999, vol. 5, 774-779 [0381]
 - **ELLMARK et al.** Identification of a Strongly Activating Human Anti-Cd40 Antibody that Suppresses HIV Type 1 Infection. *AIDS Research and Human Retro- viruses*, 2008, vol. 24 (3), 367-373 [0381]
 - **ELLMARK et al.** Modulation of the CD40-CD40L ligand interaction using human anti-CD40 single-chain antibody fragments obtained from the n-CoDeR® phage display library. *Immunology*, vol. 106, 456-463 [0381]
 - **FELLOUSE, F.A. et al.** High-throughput generation of synthetic antibodies from highly functional minimalist phage-displayed libraries. *J Mol Biol*, 2007, vol. 373, 924-940 [0381]
 - **FRANCISCO et al.** Agonistic properties and in vivo antitumor activity of the anti-CD40 antibody SGN-14. *Cancer Research*, 2000, vol. 60, 3225-3231 [0381]
 - **FRENCH, R.R. et al.** CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med*, 1999, vol. 5, 548-53 [0381]
 - **GATENBY et al.** Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nature review Cancer*, 2004, vol. 4, 891-899 [0381]
 - **GLAUDE et al.** The CD40 agonist antibody CP-870,893 enhances dendritic cell and B-cell activity and promotes anti-tumor efficacy in SCID-hu mice. *Cancer Immunol Immunotherapy*, 2011, vol. 60 (7), 1009-17 [0381]
 - **HUSSEIN et al.** A phase I multi-dose study of dace- tumuzumab (SGN-40, a humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with multiple myeloma. *Haematologica*, 2010, vol. 95, 845-848 [0381]

- KAI et al. *Nature Biotechnology*, 2008, vol. 26, 209-211 [0381]
- KALBASI, A. et al. CD40 expression by human melanocytic lesions and melanoma cell lines and direct CD40 targeting with the therapeutic anti-CD40 antibody CP-870,893. *J Immunother*, 2010, vol. 33, 810-816 [0381]
- KATAKURA et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2008 [0381]
- KOIDE, A. et al. Exploring the capacity of minimalist protein interfaces: interface energetics and affinity maturation to picomolar KD of a single-domain antibody with a flat paratope. *J Mol Biol*, 2007, vol. 373, 941-953 [0381]
- LAW et al. Preclinical antilymphoma activity of a humanized anti-CD40 monoclonal antibody, SGN-14. *Cancer Research*, 2005, vol. 65 (18), 8331-8338 [0381]
- LOSKOG, A.S.; ELIOPOULOS, A.G. The Janus faces of CD40 in cancer. *Semin. Immunol*, 2009, vol. 21, 301-307 [0381]
- QUEZADA, S.A. ; JARVINEN, L.Z. ; LIND, E.F. ; NOELLE, R.J. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, vol. 22, 307-28 [0381]
- SCHONBECK, U.; LIBBY, P. The CD40/CD154 re- ceptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*, 2001, vol. 58, 4-43 [0381]
- SIEPMANN et al. Rewiring CD40 is necessary for deliveru of rescue signals to B cells in germinal centres and subsequent entry into the memory pool. *Immunology*, 2001, vol. 102 (3), 263-72 [0381]
- SKLAR et al. *Annual Review Biophysical Biomol Structure*, 2002, vol. 31, 97-119 [0381]
- SODERLIND, E. et al. Recombining germline-de- rived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nat Biotechnol*, 2000, vol. 18, 852-6 [0381]
- SOTOMAYOR, E.M. et al. Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through in vivo ligation of CD40. *Nature Medicine*, 1999, vol. 5, 780-787 [0381]
- STAVELEY-O'CARROLL, K. et al. In vivo ligation of CD40

- enhances priming against the endogenous tumor antigen and promotes CD8+ T cell effector function in SV40 T antigen transgenic mice. *J Immunol*, 2003, vol. 171, 697-707 [0381]
- **SUMMERHAYES ; FRANKS.** *Journal of the National Cancer Institute*, 1979, vol. 62, 1017-1023 [0381]
 - **TASCI, I. et al.** Soluble CD40 ligand levels in otherwise healthy subjects with impaired fasting glucose. *Cell. Life. Sci.*, 2001, vol. 58, 4-43 [0381]
 - **TONG et al.** CD40-directed gene therapy shows prospects for treating human cancers. *Cancer Gene Therapy*, 2003, vol. 10 (1), 1-13 [0381]
 - **TUTT et al.** T cell immunity to lymphoma following treatment with anti-CD40 monoclonal antibody. *J Immunol*, 2002, vol. 168 (6), 2720-8 [0381]
 - **VAN KOOTEN ,C. ; BANCHEREAU, J.** CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 2000, vol. 67, 2-17 [0381]
 - **VAN MIERLO,G.J. et al.** CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 2002, vol. 99, 5561-5566 [0381]
 - **WHITE et al.** Interaction with Fc γ RIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody. *Journal of Immunology*, 2011, vol. 187, 1754-1763 [0381]
 - **WILSON et al.** *Cancer Cell*, 2011, vol. 19, 101-113 [0381]

Lisboa, 31 de Janeiro de 2018

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo ou um respectivo fragmento de ligação ao antígeno, com uma especificidade de ligação multivalente para o CD40, em que o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia leve variável (V_L) na qual o CDR1 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos:

CTGSX₁SNIGAGYX₂VY [SEQ ID NO:1]

em que:

X₁ é S ou T; e

X₂ é K ou H ou D ou G ou N

em que o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia leve variável (V_L) na qual o CDR2 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos:

X₃NINRPS [SEQ ID NO:2]

em que:

X₃ é G ou R

em que o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia leve variável (V_L) na qual o CDR3 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos:

CAAWDX₄X₅X₆X₇GLX₈ [SEQ ID NO:3]

em que:

X₄ é D ou S ou E ou G ou K; e

X₅ é S ou T ou G; e

X₆ é L ou S ou T ou L ou I; e

X₇ é S ou T ou L; e

X₈ é V ou L

em que o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia pesada variável (V_H) na qual o CDR1 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos:

GFTFSTYGMH [SEQ ID NO:28]

em que o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia pesada variável (V_H) na qual o CDR2 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos:

GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO:29]

em que o anticorpo ou fragmento compreende uma cadeia pesada variável (V_H) na qual o CDR3 compreende ou consiste na sequência de aminoácidos:

CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO:30]

em que a potência do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno para a ativação de células dendríticas é mais alta que, ou é igual à sua potência para a ativação de células B e em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno tem uma afinidade (KD) ao CD40 de menos de 1×10^{-10} M em que o anticorpo ou um respectivo fragmento de ligação ao antígeno é capaz de ligar-se ao domínio 1 do CD40 e em que a afinidade (KD) ao CD40 é medida por ressonância plasmônica de superfície.

2. Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a Reivindicação 1, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tem uma potência mais alta para a ativação de células dendríticas do que a do anticorpo B44 que compreende uma sequência de aminoácidos de cadeia leve variável com SEQ ID NO:58 e uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável com SEQ ID NO:60.

3. Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a Reivindicação 1 ou 2, em que o anticorpo ou fragmento compreende os CDRs seguintes:

(i) SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:12 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou

(ii) SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou

(iii) SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:12 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou

(iv) SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:14 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou

(v) SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:15 e SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou

(vi) SEQ ID NO:8 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:16 e

SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou

(vii) SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:17 e
SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou

(viii) SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:12 e
SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30; ou

(ix) SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:18 e
SEQ ID NO:28 e SEQ ID NO:29 e SEQ ID NO:30.

4. Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de acordo com qualquer reivindicação anterior, que compreende uma região Fc de anticorpo a partir de um anticorpo IgG1.

5. Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a Reivindicação 4, em que a região Fc compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:62.

6. Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de acordo com qualquer reivindicação anterior, compreendendo adicionalmente uma fração citotóxica.

7. Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a Reivindicação 6, em que a fração citotóxica é capaz de converter um pró-fármaco não-citotóxico num fármaco citotóxico ou em que a fração citotóxica é um radiosensibilizante.

8. Uma molécula de ácido nucleico que codifica um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tal como definido em qualquer uma das Reivindicações 1 até 7.

9. Um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico tal como definido na Reivindicação 8.

10. Uma célula hospedeira recombinante que compreende uma molécula de ácido nucleico tal como definido na Reivindicação 8 ou um vetor tal como definido na Reivindicação 9.

11. Uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tal como definido em qualquer uma das Reivindicações 1 até 7, e um tampão, excipiente, diluente ou veículo farmacêuticamente aceitáveis, em que a composição farmacêutica é opcionalmente adequada para administração parenteral e/ou administração local no ou perto do local de um tumor.

12. Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno tal como definido em qualquer uma das Reivindicações 1 até 7, ou uma molécula de ácido nucleico tal como definida na Reivindicação 8, ou um vetor tal como definido na Reivindicação 9, ou uma célula hospedeira tal como definida na Reivindicação 10, ou uma composição farmacêutica tal como definida na Reivindicação 11, para utilização no tratamento do cancro.

13. Um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, ou uma molécula de ácido nucleico, ou um vetor, ou uma célula hospedeira, ou uma composição farmacêutica para utilização de acordo com a Reivindicação 12, em que o cancro é seleccionado a partir do grupo que consiste em: cancro da próstata; cancro da mama; cancro colorrectal; cancro pancreático; cancro dos ovários; cancro do pulmão; cancro cervical; rabdomiossarcoma; neuroblastoma; mieloma múltiplo; leucemia; leucemia linfoblástica aguda; melanoma; cancro da bexiga e glioblastoma.

Lisboa, 31 de Janeiro de 2018

Figura 1

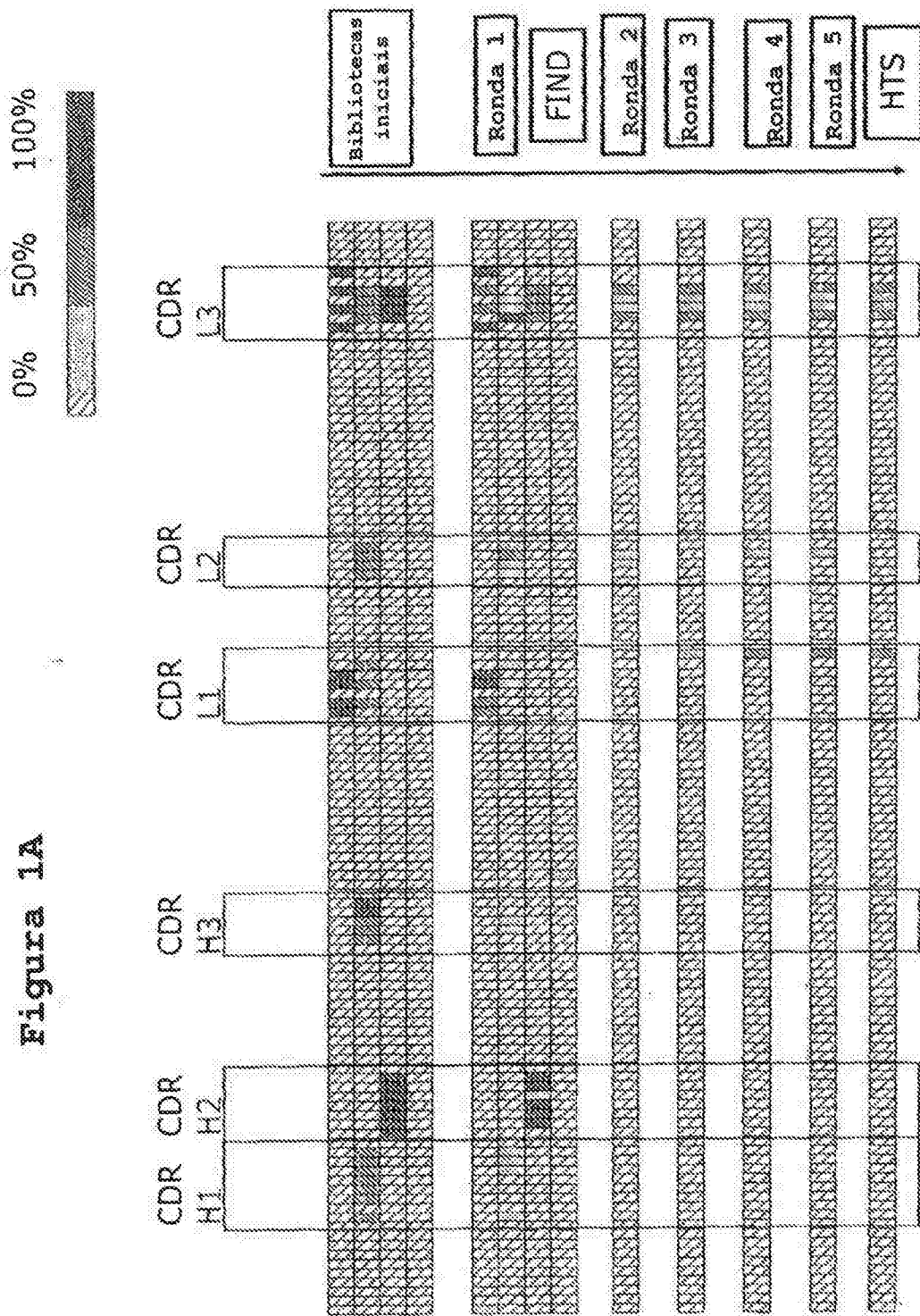


Figura 1 (continuação)

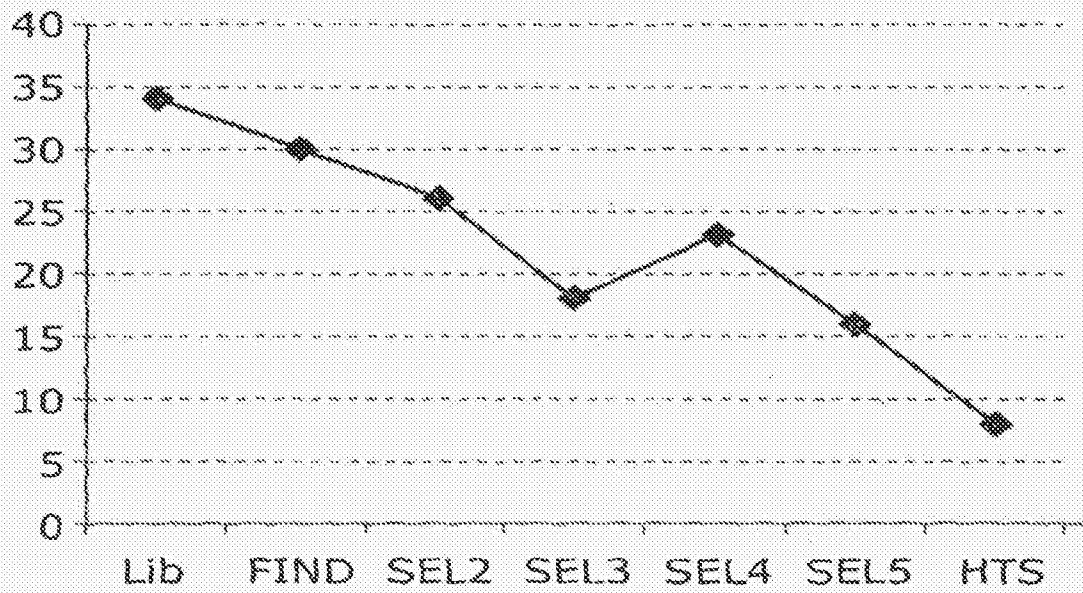


Figura 1B

Figura 2

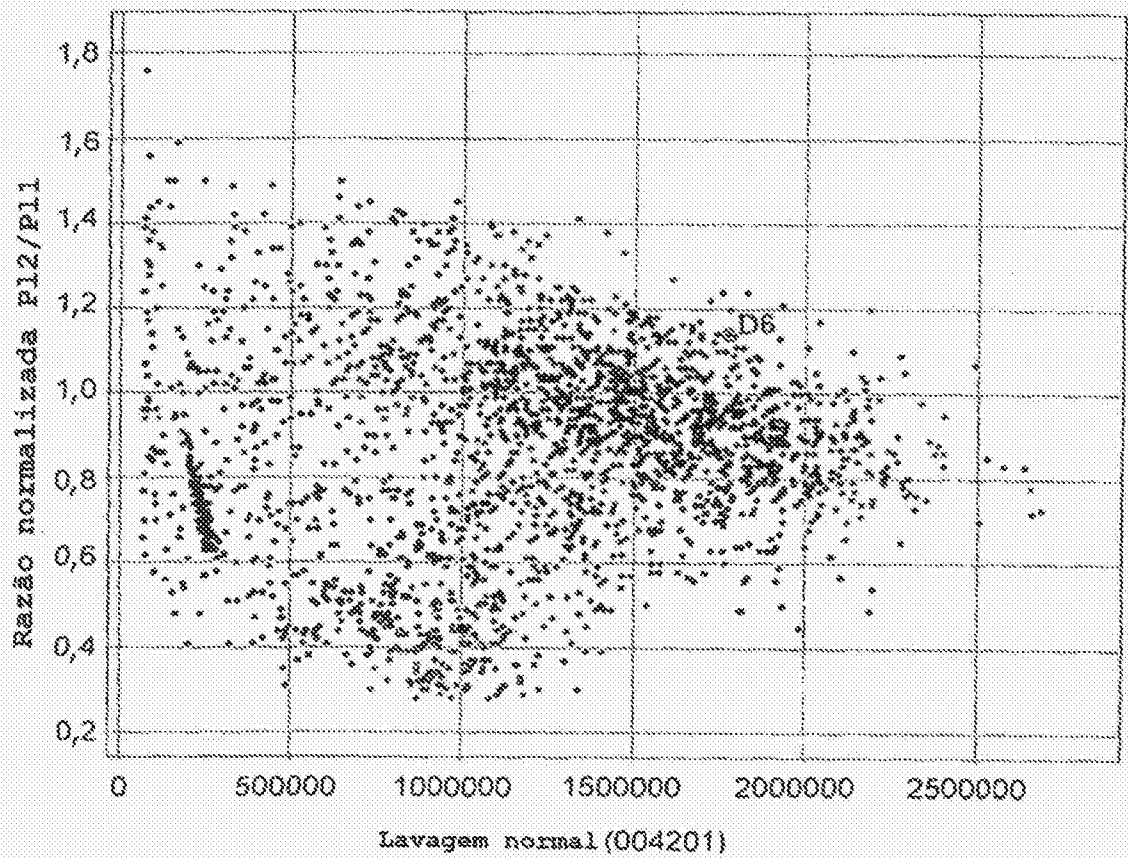


Figura 3

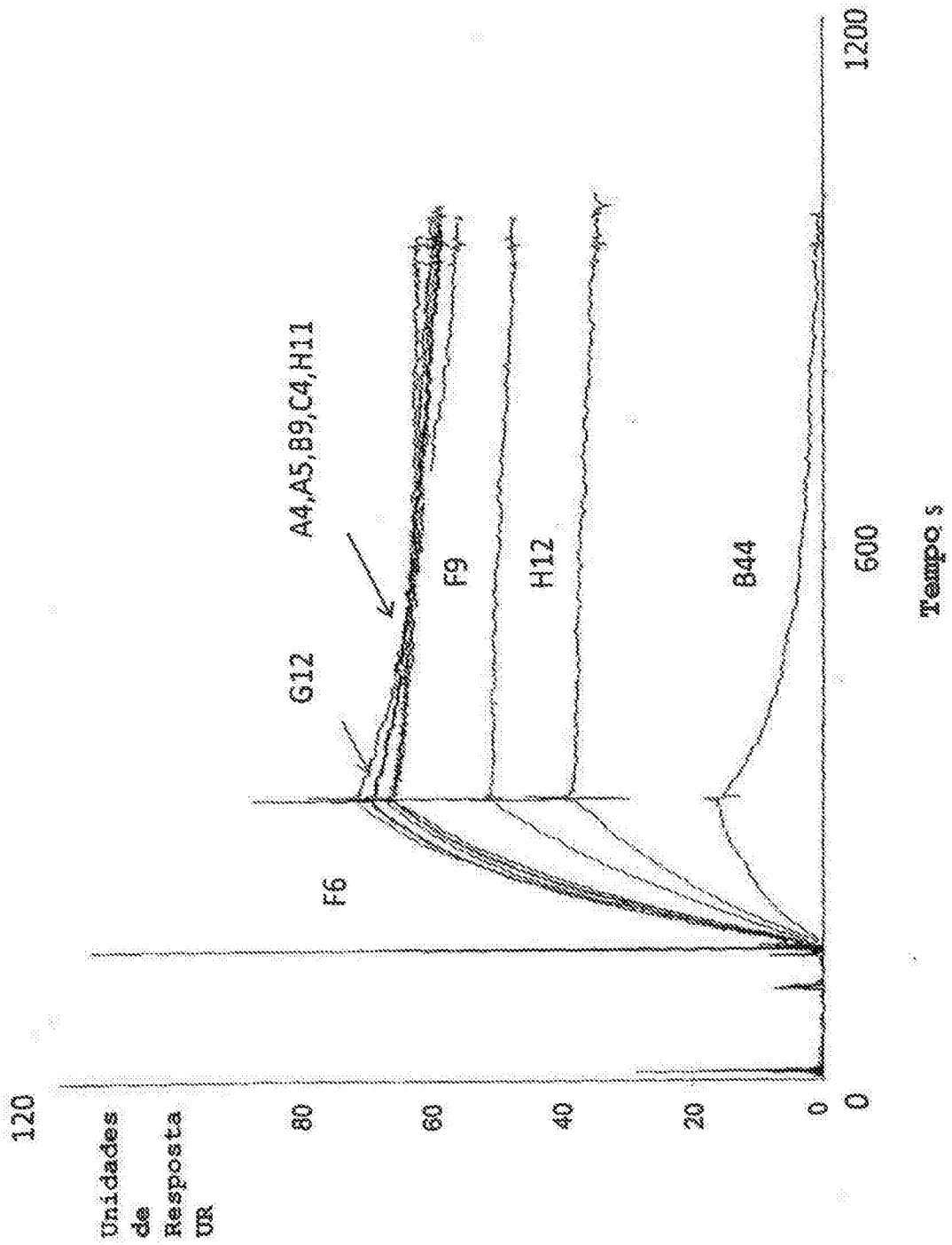


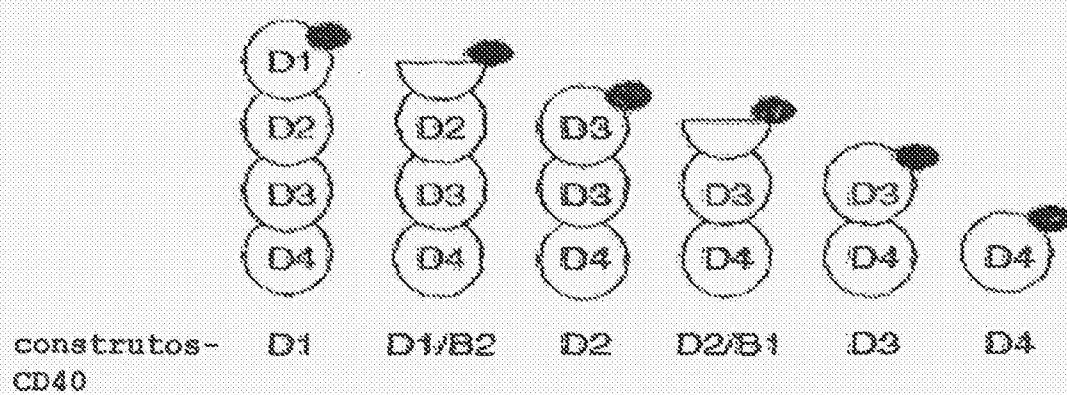
Figura 4

Figura 5

A

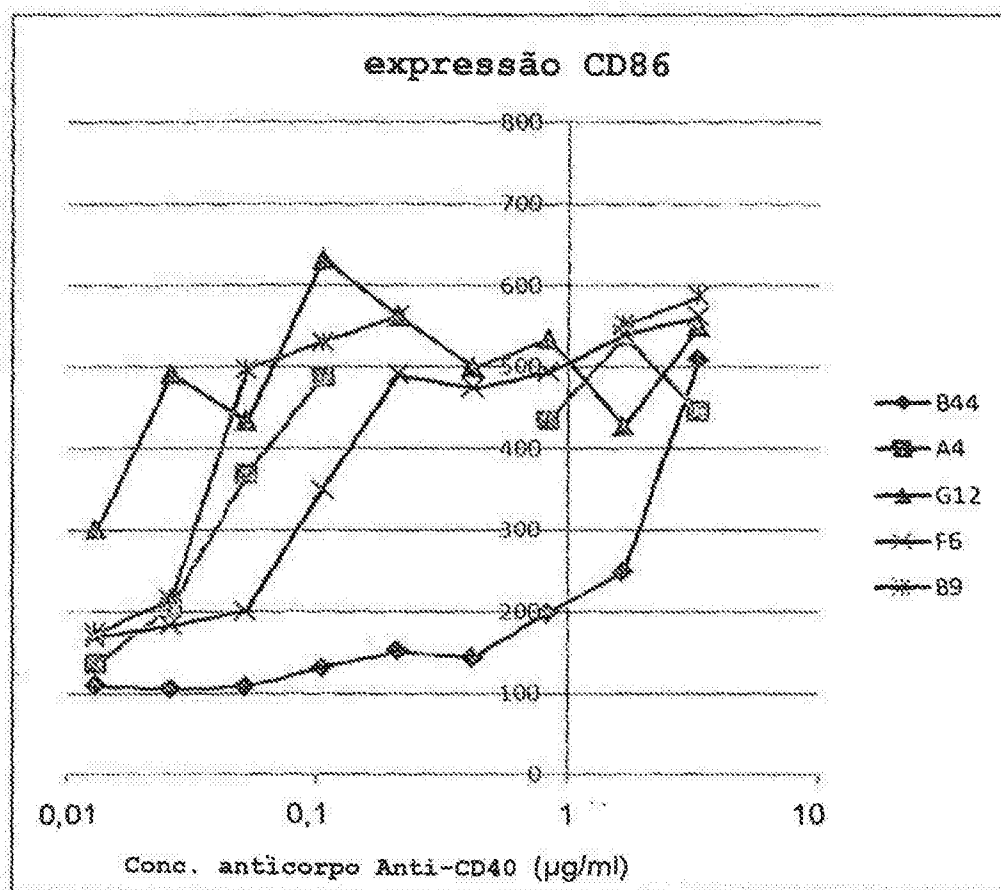


Figura 5 (continuação)

B

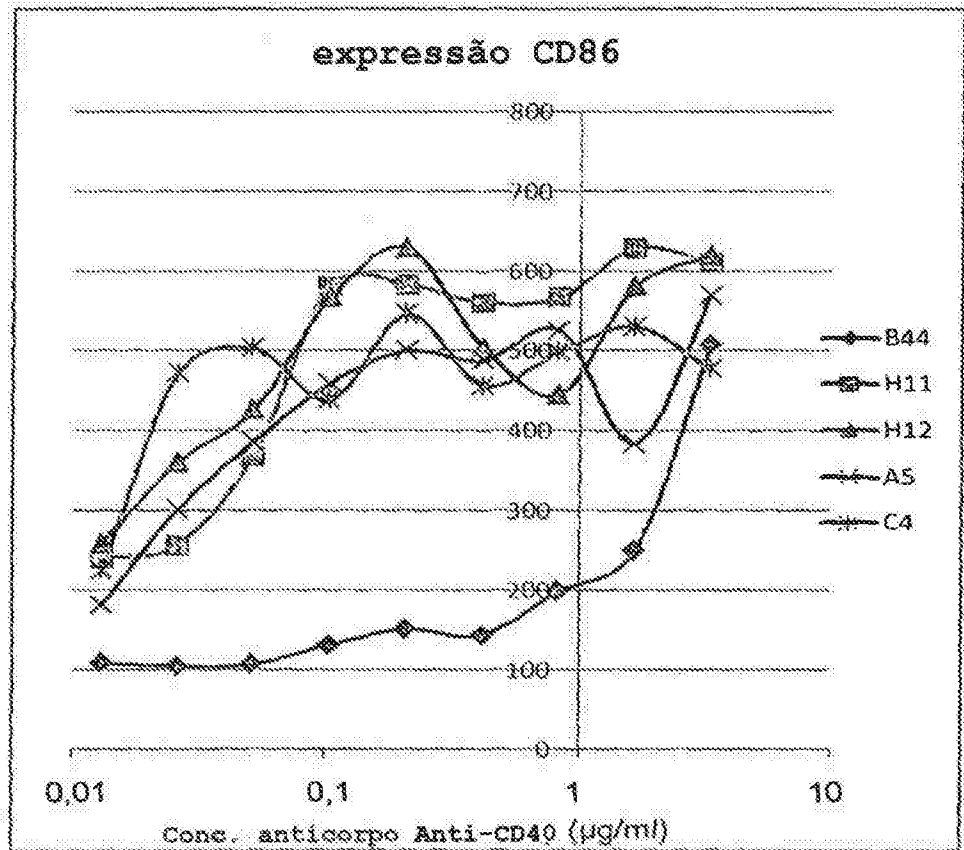


Figura 6

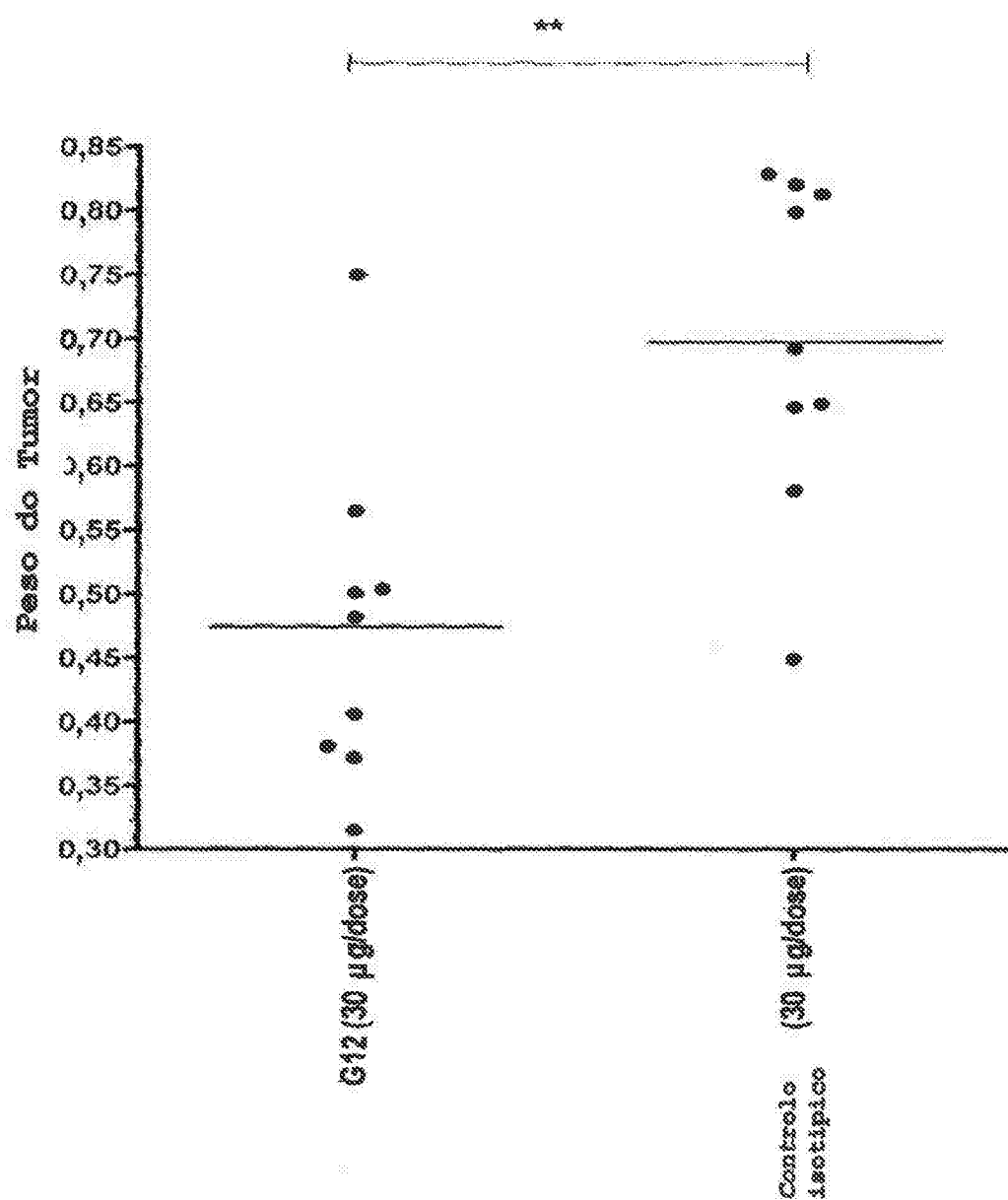


Figura 7

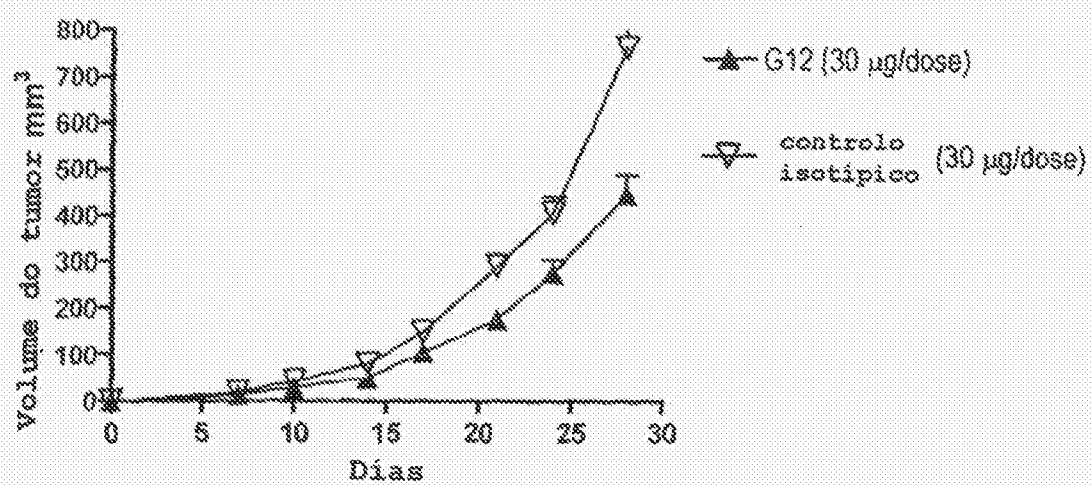


Figura 9

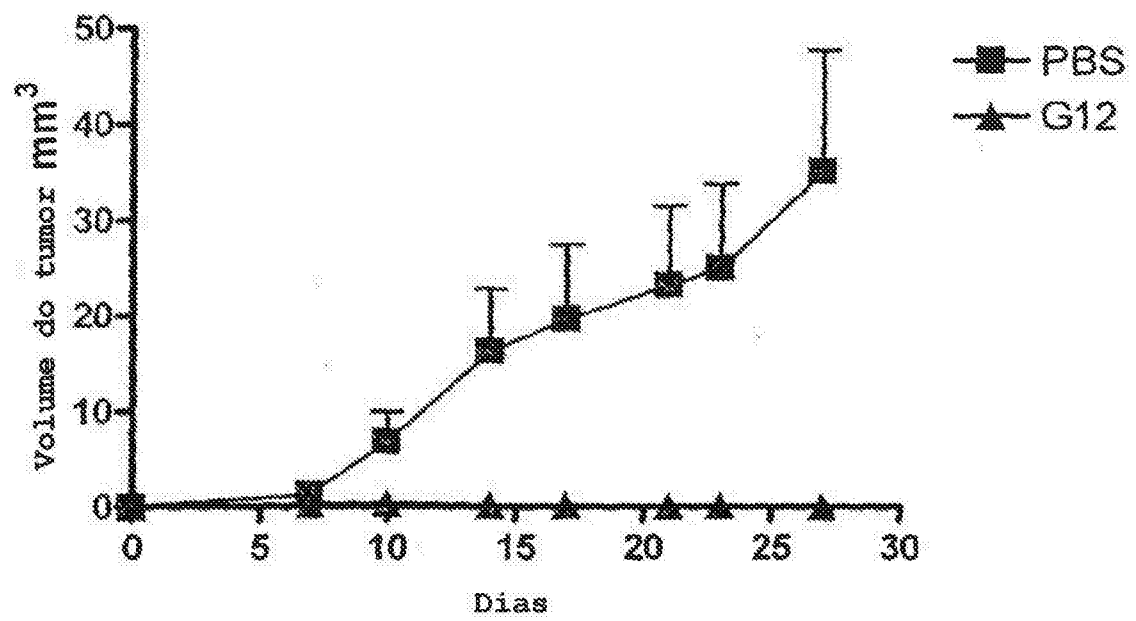


Figura 10

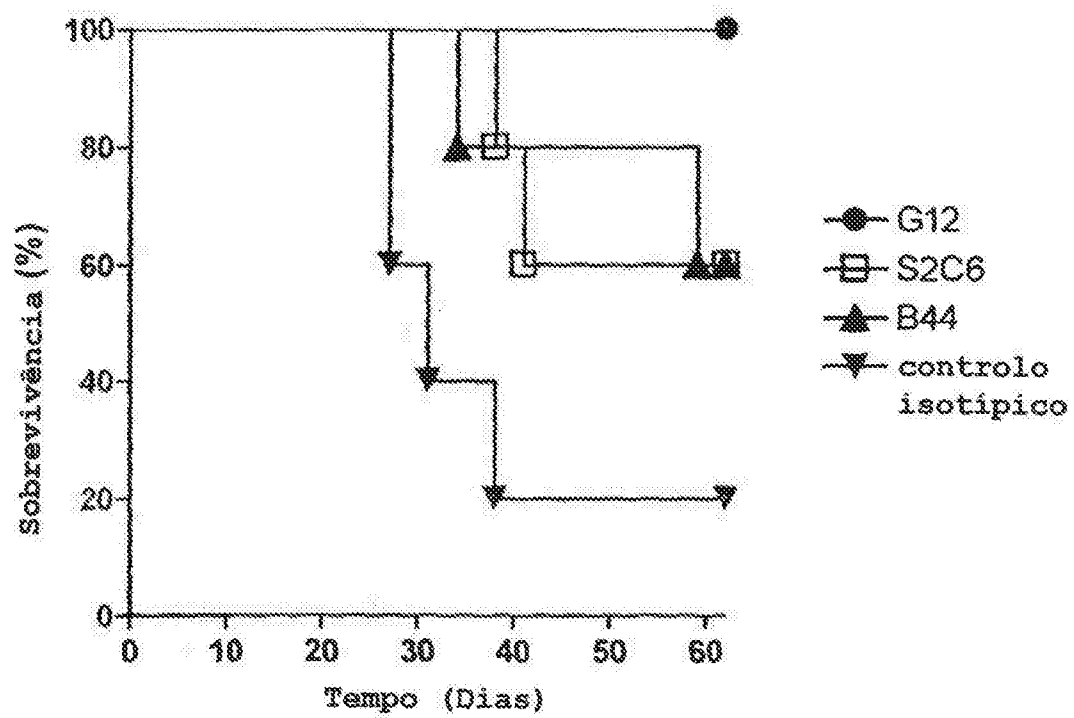


Figura 11

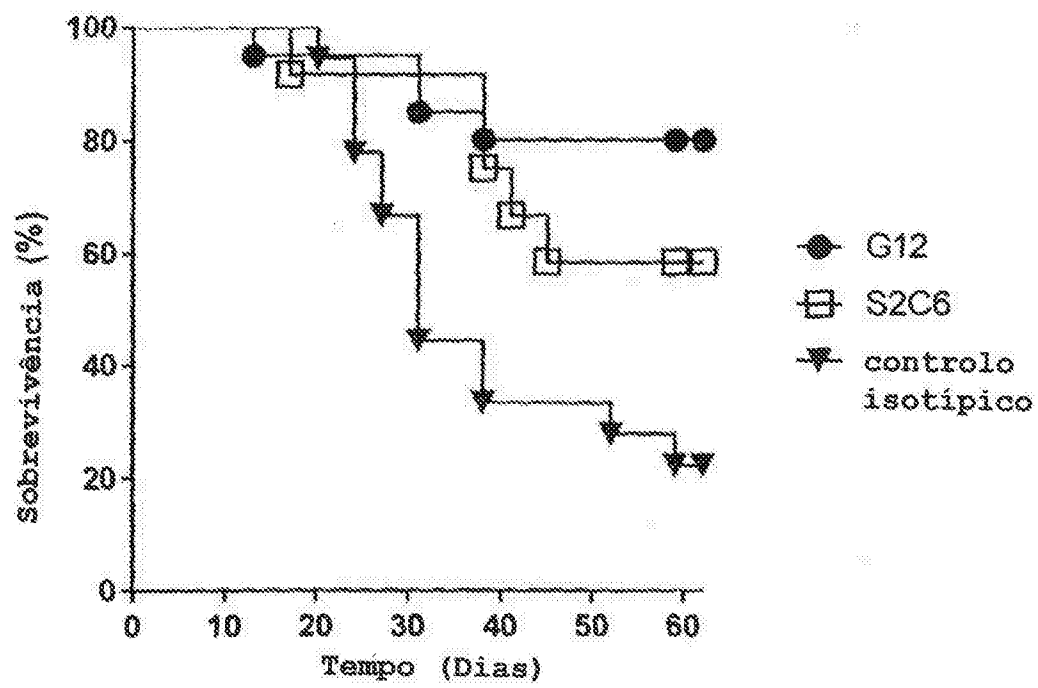


Figura 12

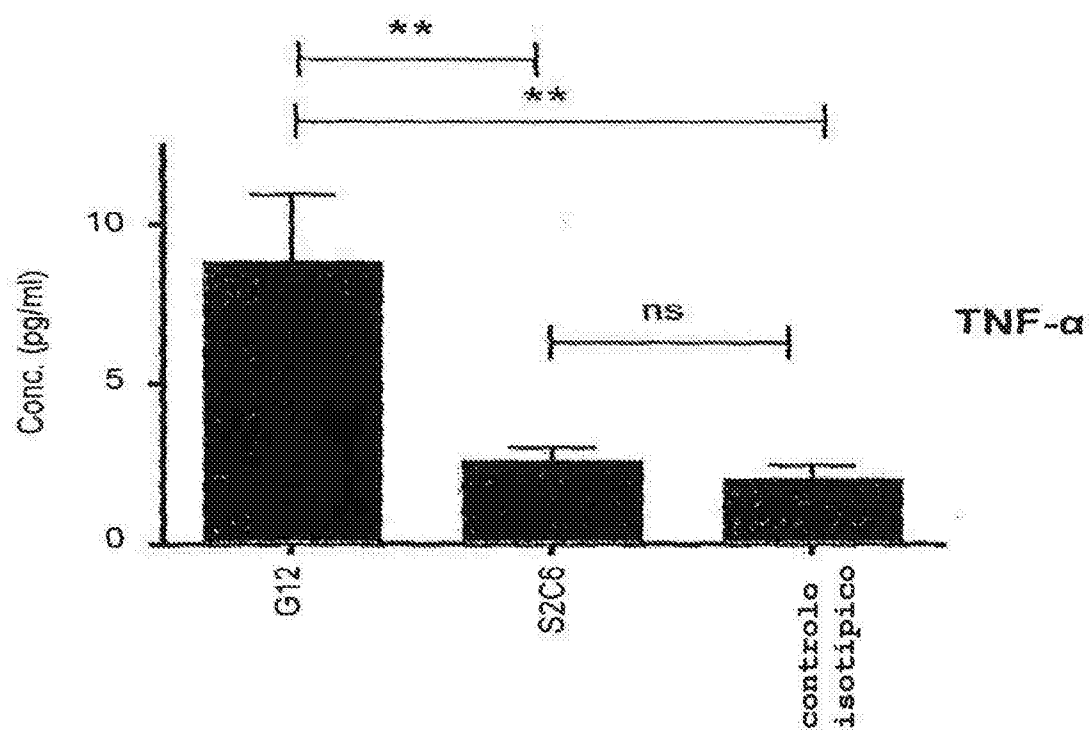
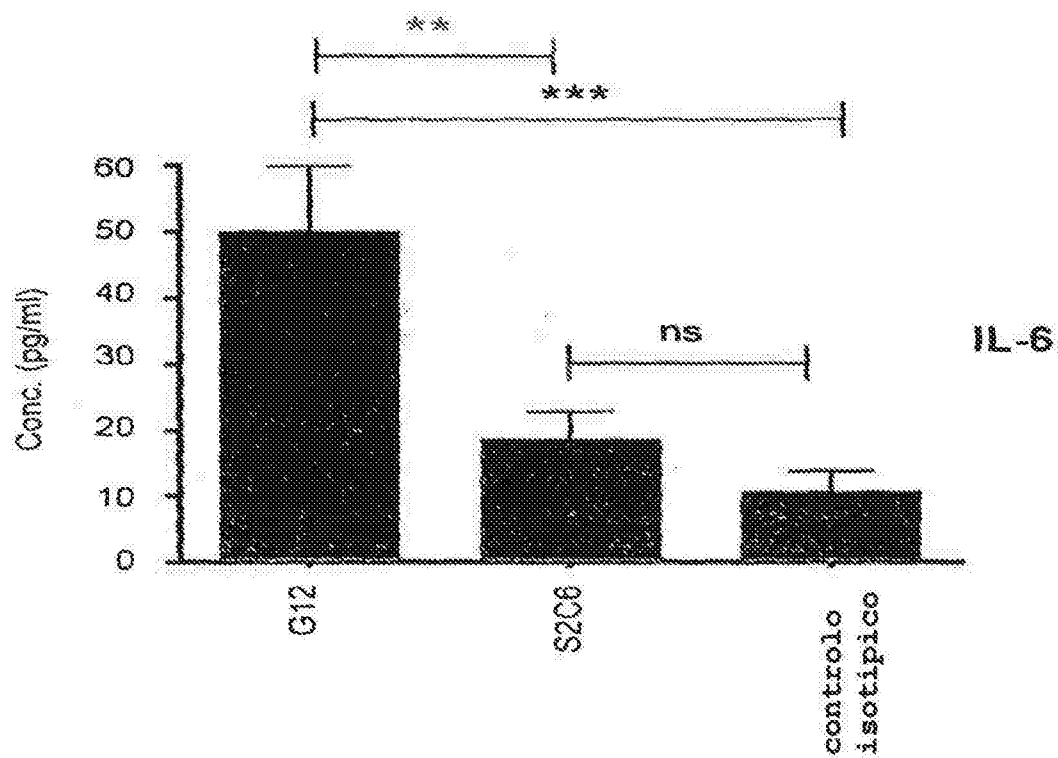


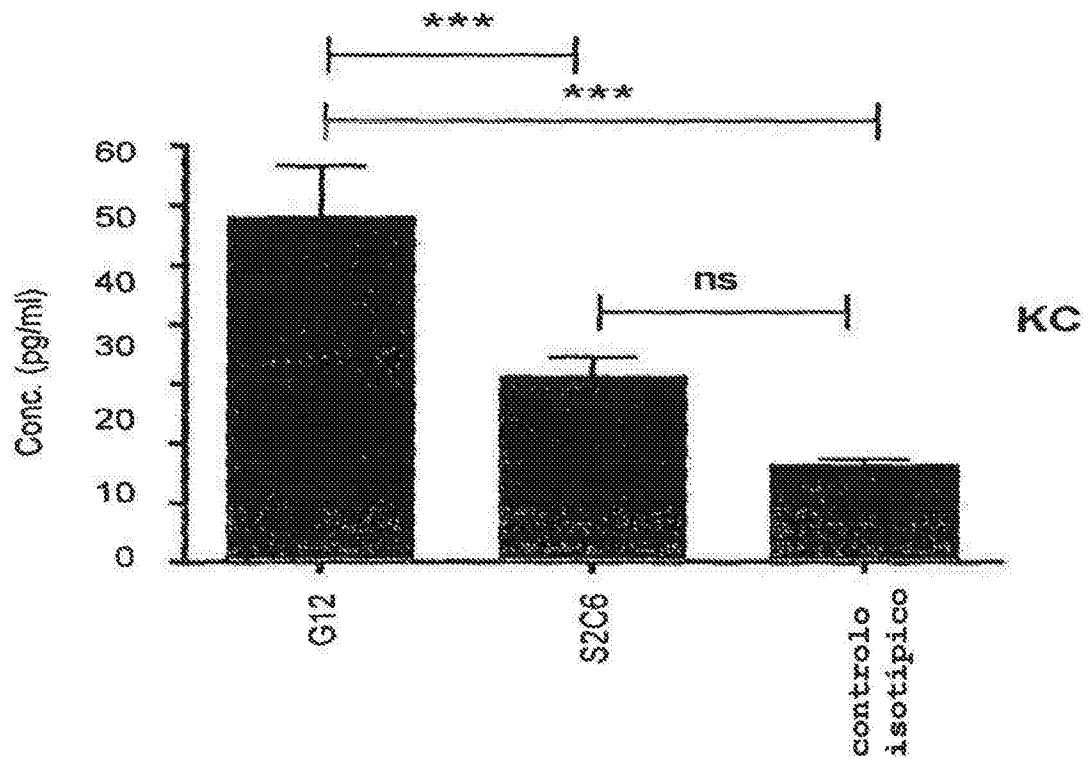
Figura 12 (continuação)

Figura 13

